

MODIFIED BIOLOGICAL SUBSTANCE, PROCESS FOR PRODUCING THE SAME, AND INTERMEDIATE

Publication number: WO2004046222 (A1)

Publication date: 2004-06-03

Inventor(s): NAKAMOTO KEN-ICHIRO; OHHASHI SYUNSUKE; YAMAMOTO YUJI; SAKANOUÉ KENJI; ITO CHIKA; YASUKOHCHI TOHRU +

Applicant(s): NOF CORP [JP] +

Classification:




- **international:** **A61K47/48; A61P43/00; C07C43/13; C07C43/164; C07K14/47; C08G65/26; C08G65/28; C08G65/329; C08G85/00; A61K47/48; A61P43/00; C07C43/00; C07K14/435; C08G65/00; C08G85/00;** (IPC1-7): A61K38/17; A61K38/43; A61K47/48; A61P43/00; C08G65/28; C08G65/32

- **European:** A61K47/48H4P; C08G65/26C1L; C08G65/329

Application number: WO2003JP14844 20031120






Priority number(s): JP20020337113 20021120

Also published as:

 US2005058620 (A1)
 US2009192320 (A1)
 US2005288490 (A1)
 US7524875 (B2)
 KR20050083923 (A)

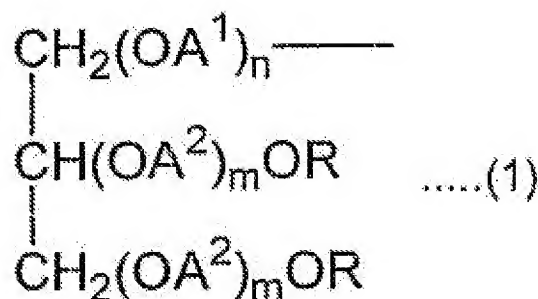
more >>

Cited documents:

 JP8059818 (A)
 JP11228685 (A)
 JP2000001541 (A)
 JP2003113241 (A)
 JP6145341 (A)

Abstract of WO 2004046222 (A1)

A modified biological substance having, per molecule, at least one polyalkylene glycoloxy group represented by the following formula (1): (1) wherein R is a C1-24 hydrocarbon group and OA<1> and OA<2> each is C2-4 oxyalkylene, provided that R and OA<2> in the same molecule are the same or different; and n and m, which indicate the average number of moles of the oxyalkylene added, are 0 to 1,000 and 10 to 1,000, respectively.



.....
 Data supplied from the **espacenet** database — Worldwide

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004 年 6 月 3 日 (03.06.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/046222 A1(51) 国際特許分類⁷: C08G 65/32, A61K 47/48,
38/17, 38/43, A61P 43/00, C08G 65/28(YASUKOHCHI,Tohru); 〒224-0033 神奈川県 横浜市
都筑区茅ヶ崎東 1-1-3-4 0 1 Kanagawa (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/014844

(74) 代理人: 小栗 昌平, 外(OGURI,Shohei et al.); 〒107-
6028 東京都港区赤坂一丁目 1 2 番 3 2 号 アーク森
ビル 2 8 階 栄光特許事務所 Tokyo (JP).

(22) 国際出願日: 2003 年 11 月 20 日 (20.11.2003)

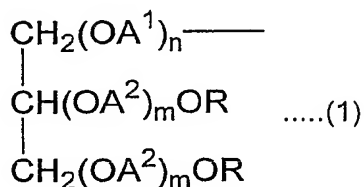
(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2002-337113
2002 年 11 月 20 日 (20.11.2002) JP(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR,
HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI,
NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG,
SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.(71) 出願人: 日本油脂株式会社 (NOF CORPORATION)
[JP/JP]; 〒150-6019 東京都渋谷区恵比寿四丁目 2 0 番
3 号 Tokyo (JP).(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (BW, GH, GM, KE, LS,
MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特
許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッ
パ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK,
TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).(72) 発明者: 中本 憲一郎 (NAKAMOTO,Ken-ichiro);
〒246-0015 神奈川県横浜市瀬谷区本郷
2-13-1-503 Kanagawa (JP). 大橋 俊輔
(OHASHI,Shunsuke); 〒210-0804 神奈川県川
崎市川崎区藤崎 2-3-9 Kanagawa (JP). 山本 裕
二 (YAMAMOTO,Yuji); 〒142-0063 東京都品川
区荏原 6-8-4-102 Tokyo (JP). 坂上 研二
(SAKANOE,Kenji); 〒210-0804 神奈川県川崎
市川崎区藤崎 2-3-9 Kanagawa (JP). 伊藤 智佳
(ITO,H,Chika); 〒211-0016 神奈川県川崎市中原区
市ノ坪 2 9 1-8-503 Kanagawa (JP). 安河内 徹添付公開書類:
— 国際調査報告書2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: MODIFIED BIOLOGICAL SUBSTANCE, PROCESS FOR PRODUCING THE SAME, AND INTERMEDIATE

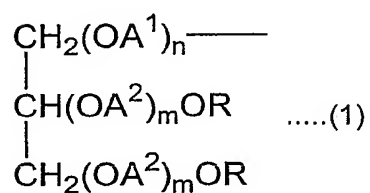
(54) 発明の名称: 修飾された生体関連物質、その製造方法および中間体

(57) Abstract: A modified biological substance having, per molecule, at least one polyalkylene glycoloxy group represented by the following formula (1): (1) wherein R is a C₁₋₂₄ hydrocarbon group and OA¹ and OA² each is C₂₋₄ oxyalkylene, provided that R and OA² in the same molecule are the same or different; and n and m, which indicate the average number of moles of the oxyalkylene added, are 0 to 1,000 and 10 to 1,000, respectively.



(57) 要約:

分子中に少なくとも 1 個の下記式 (1) で表されるポリアルキレングリコールオキシ基を結合してなる、修飾された生体関連物質。



(式中、R は炭素数 1 ～ 24 の炭化水素基であり、 OA^1 、 OA^2 は炭素数 2 ～ 4 のオキシアルキレン基であり、R、 OA^2 は一分子中で互いに同一または異なっており、n および m は前記オキシアルキレン基の平均付加モル数であり、n は 0 ～ 1000 を示し、m は 10 ～ 1000 を示す。)

明細書

修飾された生体関連物質、その製造方法および中間体

<技術分野>

本発明は、ポリアルキレングリコール誘導体との結合によって修飾された生体関連物質、その製造方法、および中間体である反応性ポリアルキレングリコール誘導体に関する。

<背景技術>

近年、生理活性を有するタンパク質、ポリペプチド、合成化合物、及び天然資源より抽出された化合物等が数多く発見されており、それらの医薬品への応用が盛んに研究されている。しかし、これらの生理活性物質は、生体内に投与された際の血中半減期が短く、十分な薬理効果を得ることは難しい。これは、通常生体内へ投与された生理活性物質が、腎臓における糸球体濾過や、肝臓や脾臓などにおけるマクロファージの取り込みにより、生体内から消失するためである。このため、これらの生理活性物質をリポソームやポリマーミセル中へ封入したり、両親媒性高分子であるポリエチレングリコールを化学修飾させて分子量を増大させることで、生体内挙動を改善する試みがなされている。ポリエチレングリコールは、その立体反発効果のために他の生体成分との相互作用が低く、結果、ポリエチレングリコールで修飾したタンパク質や酵素等のポリペプチドは、生体内へ投与された場合、腎臓における糸球体濾過や免疫反応等の生体反応を回避させる効果があり、非修飾のものより長い血中半減期を達成する。また、毒性や抗原性も低下し、更には、疎水性の高い難水溶性の化合物の溶解性を高める効果もある。

従来、生理活性物質をポリエチレングリコール修飾する場合、特に低分子薬剤やペプチドを修飾する場合、ポリエチレングリコール修飾に用いることができる反応性官能基が少ないという問題点があった。更には、十分なポリエチレングリコール修飾の効果を得るために、数多くのポリエチレングリコール分子で修飾した場合、ペプチドや薬剤の活性点を封鎖してしまい、それ自身が持つ機能、薬効を十分に発現できなくなったり、十分な水への溶解性が得られなく

なるという問題点があった。

このような問題点を解決するために、分岐型のポリエチレングリコール誘導体を用い、ポリエチレングリコールの修飾数を減らし、この問題点を解決しようとする試みがなされている。特公昭61-42558号公報には、ポリエチレングリコール化L-アスパラギナーゼが提案されている。しかしながら、反応性ポリエチレングリコール誘導体の原料である塩化シアヌルには3つの反応性部位があり、ここに2本のポリエチレングリコール鎖を選択的に導入することは困難であり、純度の高いポリエチレングリコール化L-アスパラギナーゼを合成するのは困難である。

また、特開平10-67800号公報には、ポリエチレングリコール化インターフェロン α が提案されている。しかしながら、この物質はインターフェロン α とポリエチレングリコールオキシ基との結合部位も含めて、ウレタン結合やアミド結合が3個存在する。これらの結合は保存中、あるいはアルカリ性条件下での反応中に加水分解を受けやすく、結果、分岐型ポリエチレングリコール部分が一本鎖に分解してしまうという問題点があった。これは、中間原料のポリエチレングリコール誘導体が、2本のモノメトキシポリエチレングリコールとリジンの α 位および ϵ 位のアミノ基とウレタン結合にて結合させた後、リジンのカルボキシル残基をコハク酸イミドエステルへ変換させる方法で製造されるためである。また、このポリエチレングリコール化インターフェロン α を製造するためには、2本のモノメトキシポリエチレングリコール末端水酸基の活性化、リジンとの結合、リジンのカルボキシル残基の活性化、インターフェロン α との結合等、多段階の工程数を経るため、不純物も多くなるという問題点もある。

そのため、安定性の高い結合で形成された生体関連物質、その製造方法、及び、簡便かつ高純度に製造でき、より安定性が高い、分岐型の反応性ポリアルキレングリコール誘導体が望まれていた。

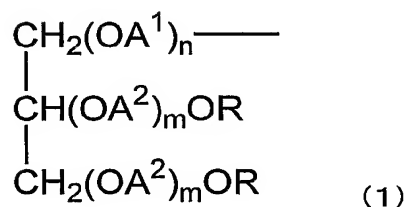
<発明の開示>

本発明の第1の目的は、安定な結合によって形成され、一本鎖に分解しにくい、分岐型ポリアルキレングリコールオキシ基を有する生体関連物質とその製造方法を提供することである。

本発明の第2の目的は、グリセリン骨格の1位の1級炭素に生体関連物質と結合可能な反応性基を、2位と3位にポリアルキレングリコール鎖を有し、生体関連物質との結合部位を除くすべての結合を安定性の高いエーテル結合で形成させるポリアルキレングリコール誘導体を提供することである。

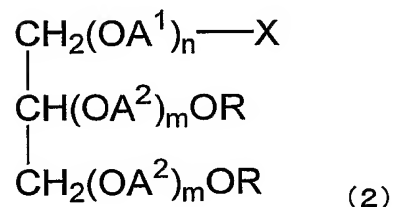
本発明者らは、上記課題を解決するため鋭意検討した結果、新規な分岐型ポリアルキレングリコールオキシ基を有する生体関連物質、その製造方法、及びその中間体となるポリアルキレングリコール誘導体を見だし、本発明を完成した。

即ち、本発明は、分子中に少なくとも1個の下記式(1)で表されるポリアルキレングリコールオキシ基を結合してなる、修飾された生体関連物質に係るものである。



(式中、Rは炭素数1～24の炭化水素基であり、OA¹、OA²は炭素数2～4のオキシアルキレン基であり、R、OA²は一分子中で互いに同一または異なっており、nおよびmはオキシアルキレン基の平均付加モル数であり、nは0～1000を示し、mは10～1000を示す。)

また、本発明は、前記修飾された生体関連物質に対する中間体であり、下記式(2)で示されることを特徴とする中間体に係るものである。



(式中、R、 OA^1 、 OA^2 、n、mは上記と同じであり、Xは、生体関連物質と化学反応可能な官能基を示す)

また、本発明は、分子中に少なくとも1個の式(1)で表されるポリアルキレングリコールオキシ基を結合してなる、修飾された生体関連物質を製造する方法であって、生体関連物質に対して前記中間体を結合する工程を有することを特徴とする。

また、本発明は式(2)の化合物の原料となる、式(p)の化合物、並びにその製造方法に係るものである。

本発明の修飾された生体関連物質は、安定な結合によって形成され、一本鎖に分解しにくい。また、グリセリン骨格の1位の1級炭素に生体関連物質と結合可能な反応性基を、2位と3位にポリアルキレングリコール鎖を有し、生体関連物質との結合部位を除くすべての結合を安定性の高いエーテル結合で形成させるポリアルキレングリコール誘導体を提供できる。

<図面の簡単な説明>

<図1> OVAと、修飾されたOVAのポリアクリルアミドゲル電気泳動法による実験結果を示す写真。

<図2> 化合物p-8の加速劣化試験前のGPC測定の結果を示すチャートである。

<図3> 化合物p-8の加速劣化試験後のGPC測定の結果を示すチャートである。

<図4> 化合物p-10の加速劣化試験前のGPC測定の結果を示すチャートである。

<図5> 化合物p-10の加速劣化試験後のGPC測定の結果を示すチャートである。

<図6> Humaninを化合物(p31)で修飾した化合物の電気泳動結果を示す写真である。

<図7> インシュリンを化合物(p32)、化合物(p35)で修飾した化合物の電気泳動結果を示す写真である。

〈発明を実施するための最良の形態〉

本発明の修飾された生体関連物質は、少なくとも1個の前記式(1)で表されるポリアルキレングリコールオキシ基に対して、生体関連物質を結合させたものである。

式(1)のポリアルキレングリコールオキシ基におけるRは、炭素数1から24の炭化水素基であり、具体的な炭化水素基としてはメチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、ブチル基、第三ブチル基、ペンチル基、イソペンチル基、ヘキシル基、ヘプチル基、2-エチルヘキシル基、オクチル基、ノニル基、デシル基、ウンデシル基、ドデシル基、トリデシル基、テトラデシル基、ペンタデシル基、ヘキサデシル基、ヘプタデシル基、オクタデシル基、オレイル基、ノナデシル基、エイコシル基、ヘンエイコシル基、ドコシル基、トリコシル基、テトラコシル基、ベンジル基、クレジル基、ブチルフェニル基、ドデシルフェニル基等の炭化水素基が挙げられるが、好ましくは炭素数1~10の炭化水素基、より好ましくはメチル基、エチル基の場合であり、更に好ましくはメチル基の場合である。

OA¹、OA²は、炭素数2~4のオキシアルキレン基を示す。具体的には、オキシエチレン基、オキシプロピレン基、オキシトリメチレン基、オキシ-1-エチルエチレン基、オキシ-1,2-ジメチルエチレン基、オキシテトラメチレン基などが挙げられる。オキシアルキレン基は同一であっても異なってもよく、またはランダム状に付加していてもブロック状に付加していてもよい。一般に、アルキレン基の炭素数の少ない方がより親水性が高く、好ましくはオキシエチレン基、オキシプロピレン基であり、より好ましくはオキシエチレン基である。mおよびnはオキシアルキレン基の平均付加モル数である。mは10~1000であり、好ましくはmは20~800であり、更に好ましくは50~800であり、最も好ましくは100~800である。nは0~1000であり、好ましくは0~500であり、更に好ましくは0~200であり、最も好ましくは0~50である。好適な実施形態においてはnが0である。他の好適な実施形態においてはnが1~50である。後者の場合には、nが1~3であることが特に好ましい。

生体関連物質へのポリアルキレングリコールオキシ基の修飾数は特に限定されないが、1~

100箇所が好ましく、更に好ましくは1～20箇所である。

本発明で言う「生体関連物質」とは、生体に関連する物質を意味する。生体に関連する物質とは、以下を含むものである。

(1) リン脂質、糖脂質、糖タンパク等の動物細胞構成材料

動物細胞構成材料とは、細胞膜等を構成する成分であり、特にその種類を限定されるものではないが、例えばリン脂質、糖脂質、糖タンパク質等が挙げられる。より具体的なリン脂質としては、例えばファスファチジジン酸、フォスファチジルコリン、フォスファチジルエタノールアミン、カルジオリピン、フォスファチジルセリン、フォスファチジルイノシトールが挙げられる。また、これらのリゾ体も含まれる。これらリン脂質は卵黄あるいは大豆等の天然物由来のものでも良いし、合成物でも良い。脂肪酸組成としては、特に限定されるものではないが、好ましくは炭素数12～22の脂肪酸が挙げられる。これらの脂肪酸は飽和脂肪酸でも良いし、不飽和結合を含んだものでも良い。より具体的な糖脂質としては、例えばセラミド、セラブロシド、スフィンゴシン、ガングリオシド、グリセロ糖脂質等が挙げられる。また、脂肪酸、モノグリセライド、ジグリセライド、コレステロール、胆汁酸もこれに含まれる。

(2) 血液、リンパ液、骨髓液等の体液構成物質

体液構成物質とは、細胞内外に存在する液体成分であり、特にその種類を限定されるものではないが、血液、リンパ液、骨髓液が挙げられる。これら体液のより具体的な構成成分としては、例えばヘモグロビン、アルブミン、血液凝固因子等が挙げられる。

(3) ビタミン、神経伝達物質、タンパク質、ポリペプチド、薬剤等の生理活性物質

生理活性物質とは、体の働きを調節する成分であり、特にその種類を限定されるものではないが、ビタミン、神経伝達物質、タンパク質、ポリペプチド、薬剤が挙げられる。

より具体的なビタミンとしては、例えばビタミンA、ビタミンB、ビタミンC、ビタミンD、ビタミンE、ビタミンK等が挙げられる。

より具体的な神経伝達物質としては、例えばアドレナリン、ノルアドレナリン、ドーパミン、アセチルコリン、GABA、グルタミン酸、アスパラギン酸等が挙げられる。

より具体的なタンパク質、ポリペプチドとしては、例えば以下に挙げられるものがある。脳下垂体ホルモン、甲状腺ホルモン、男性ホルモン、女性ホルモン、副腎皮質ホルモン等のホルモン。ヘモグロビン、血液因子等の血清タンパク質。IgG、IgE、IgM、IgA、IgD等の免疫グロブリン。インターロイキン（IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11およびIL-12サブタイプ）、インターフェロン（ α 、 β 、 γ ）、顆粒球コロニー刺激因子（ α および β 型）、マクロファージコロニー刺激因子、顆粒球マクロファージ・コロニー刺激因子、血小板由来増殖因子、ホスホリパーゼ活性化タンパク質、インシュリン、グルカゴン、レクチン、リシン、腫瘍壊死因子、上皮細胞増殖因子、トランスフォーミング増殖因子（ α 、 β ）、繊維芽細胞増殖因子、肝細胞増殖因子、血管内皮増殖因子、神経成長因子、骨増殖因子、インスリン様増殖因子、ヘパリン結合増殖因子、腫瘍増殖因子、グリア細胞株由来神経栄養因子、マクロファージ分化因子、分化誘導因子、白血病阻害因子、アンフィレグリン、ソマトメジン、エリスロポエチン、ヘモポエチン、トロンボポエチン、カルシトニン等のサイトカインおよびそのフラグメント。タンパク質分解酵素、オキシドリダクターゼ、トランスフェラーゼ、ヒドロラーゼ、リアーゼ、イソメラーゼ、リガーゼ、アスパラギナーゼ、アルギナーゼ、アルギニンデアミナーゼ、アデノシンデアミナーゼ、スーパーオキシドジスムターゼ、エンドトキシナーゼ、カタラーゼ、キモトリプシン、リパーゼ、ウリカーゼ、エラスターゼ、ストレプトキナーゼ、ウロキナーゼ、プロウロキナーゼ、アデノシンジホスファターゼ、チロシナーゼ、ビリルビンオキシターゼ、グルコースオキシダーゼ、グルコダーゼ、ガラクトシダーゼ、グルコセレブロシダーゼ、グルコウロニダーゼ等の酵素。モノクロナール及びポリクロナール抗体およびそれらのフラグメント。ポリ-L-リジン、ポリ-D-リジン等のポリアミノ酸。B型肝炎ワクチン、マラリアワクチン、メラノーマワクチン、HIV-1ワクチン等のワクチンおよび抗原。また、糖タンパクも含まれる。また、これらの生理活性物質と同様の生理活性を有する類似構造物質もこれに含まれる。

また、これらのタンパク質、ポリペプチドは、それらの天然源または遺伝子工学的処理を受

けた細胞から単離されるか、あるいは種々の合成法を経て作り出されたものでも良い。

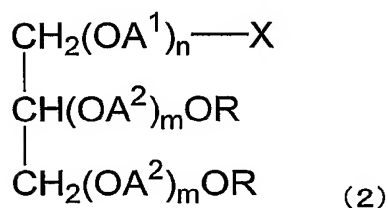
薬剤としては、特に限定されるものではないが、より好ましくは抗癌剤と抗真菌剤が挙げられる。

より具体的な抗癌剤としては、特に限定されるものではないが、例えばパクリタキセル、アドリアマイシン、ドキソルビシン、シスプラチン、ダウノマイシン、マイトマイシン、ビンクリスチン、エピルビシン、メトトレキセート、5-フルオロウラシル、アクラシノマイシン、イダマイシン、ブレオマイシン、ピラルビシン、ペプロマイシン、パンコマイシン、カンプトテシン等が挙げられる。

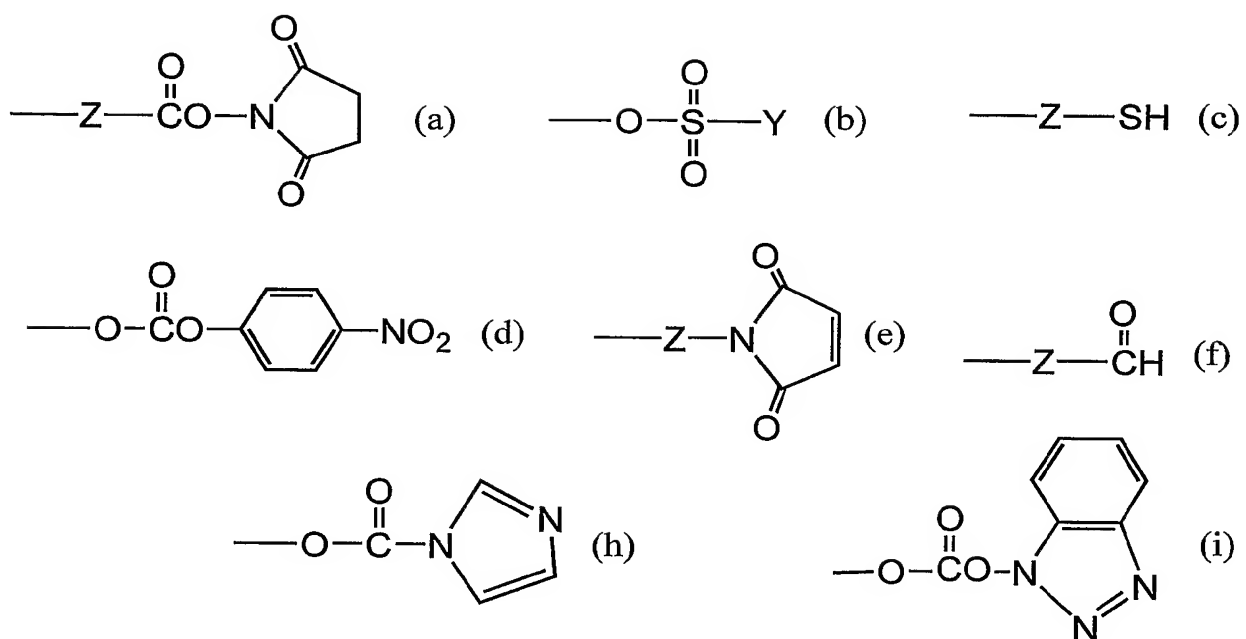
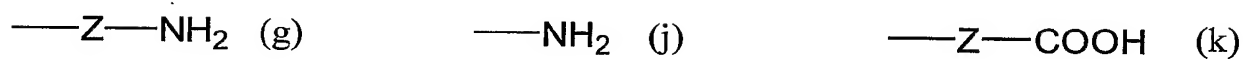
具体的な抗真菌剤としては、特に限定されるものではないが、例えばアムホテリシン B、ナイスタチン、フルシトシン、ミコナゾール、フルコナゾール、イトラコナゾール、ケトコナゾールおよびペプチド性抗真菌剤が挙げられる。

また、これら生理活性物質には、例えば抗酸化作用、PAF 阻害作用、抗炎症作用、抗菌作用等を有する、フラボノイド、テルペノイド、カルテノイド、サポニン、ステロイド、キノン、アントラキノン、キサントン、クマリン、アルカロイド、ポルフィリン、ポリフェノール等も含まれる。

本発明の生体関連物質の中間体は、下記式 (2) で示される。



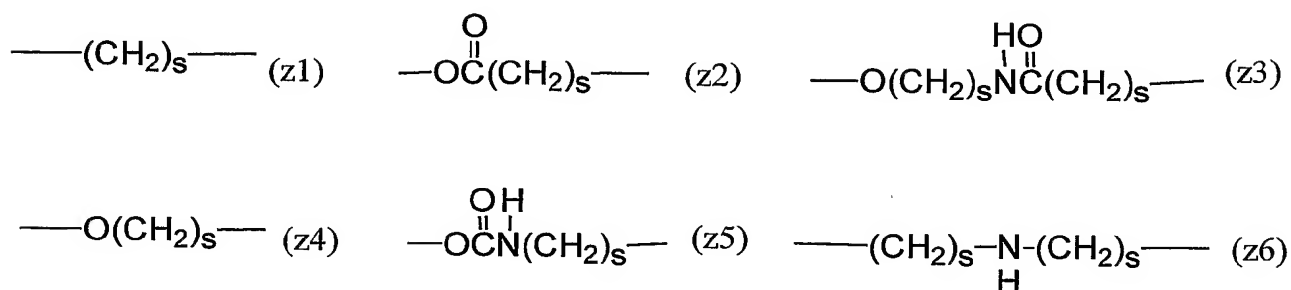
式中、X は、生体関連物質と化学結合を生成し得る官能基または不飽和結合であれば特に制限されない。好適な実施形態においては、X は、群 (I)、群 (I I) で示される基である。

群(I)群(II)

生体関連物質のアミノ基と反応させる場合は、(a)、(b)、(d)、(f)、(h)、(i)、(k)で示される基が好ましく、生体関連物質のメルカプト基と反応させる場合は、(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(h)、(i)、(k)で示される基が好ましく、生体関連物質の不飽和結合と反応させる場合は、(c)で示される基が好ましく、生体関連物質のカルボキシル基と反応させる場合は(c)、(g)、(j)で示される基が好ましい。

群(I)、群(II)におけるZは、ポリアルキレングリコールオキシ基と反応性官能基と

の間のリンカーであり、共有結合であれば特に制限は無いが、好ましくはアルキレン基、及びエステル結合、ウレタン結合、アミド結合、エーテル結合、カーボネート結合、2級アミノ基を含んだアルキレン基等が挙げられる。アルキレン基として好ましいものは、メチレン基、エチレン基、トリメチレン基、プロピレン基、イソプロピレン基、テトラメチレン基、ブチレン基、イソブチレン基、ペンタメチレン基、ヘキサメチレン基等が挙げられ、更に好ましくは下記(z1)のような構造が挙げられる。エステル結合を含んだアルキレン基として更に好ましいものは、下記(z2)のような構造が挙げられる。アミド結合を含んだアルキレン基として更に好ましいものは、下記(z3)のような構造が挙げられる。エーテル結合を含んだアルキレン基として更に好ましいものは、下記(z4)のような構造が挙げられる。ウレタン結合を含んだアルキレン基として更に好ましいものは、下記(z5)のような構造が挙げられる。2級アミノ基を含んだアルキレン基として更に好ましいものは、下記(z6)のような構造が挙げられる。各式において、sは1～6の整数であるが、好ましくはsは1～3の整数であり、更に好ましくは2～3の整数である。



Yは炭素数1～10のフッ素原子を含んでも良い炭化水素基であり、具体的にはメチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、ブチル基、第三ブチル基、ヘキシル基、ノニル基、ビニル基、フェニル基、ベンジル基、4-メチルフェニル基、トリフルオロメチル基、2, 2, 2-トリフルオロエチル基、4-(トリフルオロメトキシ)フェニル基等が挙げられるが、好



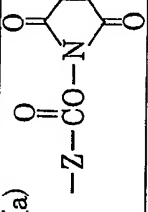
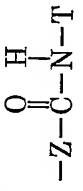
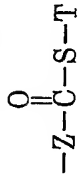


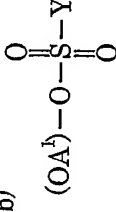
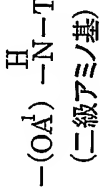
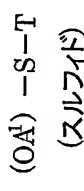


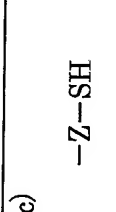
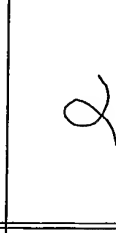
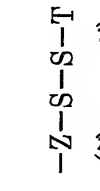
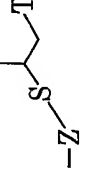
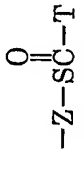
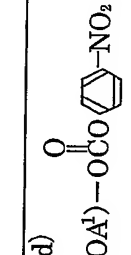
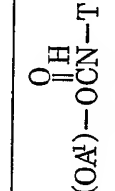
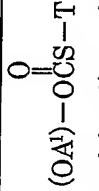
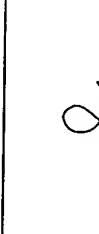
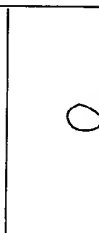
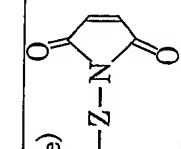
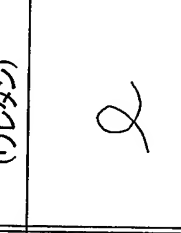
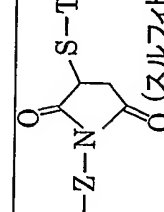
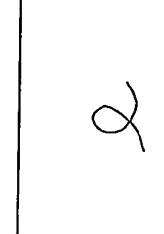
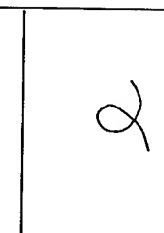
ましくはメチル基、ビニル基、4-メチルフェニル基、2, 2, 2-トリフルオロエチル基の場合である。

式(2)で表される化合物において、R、 A^1O 、 A^2O 、n、mは前述と同じである。

群(I I)におけるZ、R、 A^1O 、 A^2O 、n、mも前述と同じである。


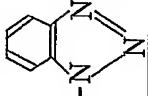
以下、前記した生体関連物質の残基Tと、この残基Tと化学結合を生成するポリアルキレングリコールオキシ基側の官能基Xとの関係を、表1、表2に示す。また、生体関連物質とXとの反応によって生成する、ポリアルキレングリコールオキシ基と生体関連物質との化学結合の種類も表1、表2に示す。

<表 1>

生理活性物質 の反応基 X 基	NH ₂ -T アミノ基	SH-T メルカプト基	 -T 不飽和結合	 HO-C-T カルボキシ基
(a) 	 -Z-C(=O)-N-T (アミド)	 -Z-C(=O)-S-T (チオエステル)		
(b) 	 -(OA ¹) -N-T (二級アミノ基)	 (OA ¹) -S-T (スルフィド)		
(c) 		 -Z-S-S-T (ジスルフィド)	 -Z-S-T (スルフィド)	 -Z-SC-T (チオエステル)
(d) 	 (OA ¹) -OCN-T (ウレタン)	 (OA ¹) -OCS-T (チオカーボネート)		
(e) 		 -Z-N-C(=O)-S-T (スルフィド)		

注 (b),(d)は(OA¹)を除く部分を X 基とする

〈表 2〉

生理活性物質 の反応基 X 基	NH ₂ -T アミノ基	SH-T メルカプト基	\backslash -T 不飽和結合	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{HO}-\text{C}-\text{T} \\ \text{カルボキシル基} \end{array}$
(f) $\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ -\text{Z}-\text{CH} \end{array}$	還元 $\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ -\text{Z}-\text{C}=\text{N}-\text{T} \\ \text{(シッフ塩基)} \\ -\text{Z}-\text{CH}_2-\text{N}-\text{T} \\ \text{(二級アミノ基)} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ -\text{Z}-\text{C}-\text{S}-\text{T} \\ \text{(スルフイド)} \end{array}$	\mathcal{Q}	\mathcal{Q}
(h) $\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ (\text{OA}^1)-\text{OC}-\text{N} \end{array}$ 	$\begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ (\text{OA}^1)-\text{OCN}-\text{T} \\ \text{(ウレタン)} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ (\text{OA}^1)-\text{OCS}-\text{T} \\ \text{(チオカーボネート)} \end{array}$	\mathcal{Q}	\mathcal{Q}
(i) $\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ (\text{OA}^1)-\text{OCO}-\text{N} \end{array}$ 	$\begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ (\text{OA}^1)-\text{OCN}-\text{T} \\ \text{(ウレタン)} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ (\text{OA}^1)-\text{OCS}-\text{T} \\ \text{(チオカーボネート)} \end{array}$	\mathcal{Q}	\mathcal{Q}
(g),(j) $-\text{Z}-\text{NH}_2$	\mathcal{Q}	\mathcal{Q}	\mathcal{Q}	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ -\text{Z}-\text{N}-\text{C}-\text{T} \\ \text{(アミド)} \end{array}$
(k) $-\text{Z}-\text{COOH}$	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ -\text{Z}-\text{C}-\text{N}-\text{T} \\ \text{(アミド)} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ -\text{Z}-\text{C}-\text{S}-\text{T} \\ \text{(チオエステル)} \end{array}$	\mathcal{Q}	\mathcal{Q}

注 (h),(i)は(OA¹)を除く部分を X 基とする

表から明らかなように、本発明の修飾された生体関連物質においては、ポリアルキレングリコールオキシ基と生体関連物質とは、例えばアミド結合、二級アミノ基、ウレタン結合、チオエステル結合、スルフィド結合、ジスルフィド結合、チオカーボネート結合によって結合されている。

本発明の修飾された生体関連物質は、以下のようにして製造することができる。

(生体関連物質のアミノ基と本発明の中間体を反応させる場合)

生体関連物質のアミノ基を用いて修飾する場合、本発明の中間体(a), (b), (d), (f), (h), (i), (k)を用いる。更に好ましくは、(a), (b), (d), (f)を用いる。反応の際には、生体関連物質に対し、本発明の中間体(a), (b), (d), (f), (h), (i), (k)を等モル以上の使用割合にて反応させればよい。反応溶媒としては、反応に関与しない溶媒であれば特に限定されないが、タンパク質、ポリペプチドを反応させる場合は、リン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、トリス酸緩衝液、酢酸緩衝液、炭酸緩衝液などの緩衝液が好ましい溶媒として挙げられる。更には、タンパク質、ポリペプチドの活性を失うことなく、反応に関与しないアセトニトリル、ジメチルスルホキシド、ジメチルホルムアミド、ジメチルアセトアミド等の有機溶媒を添加しても良い。抗癌剤、抗真菌剤、リン脂質を反応させる場合は、前述の緩衝液のほかにもトルエン、ベンゼン、キシレン、アセトニトリル、酢酸エチル、ジエチルエーテル、*t*-ブチルメチルエーテル、テトラヒドロフラン、クロロホルム、塩化メチレン、ジメチルスルホキシド、ジメチルホルムアミド、ジメチルアセトアミド、水、メタノール、エタノール、*n*-プロパノール、2-プロパノール、*n*-ブタノール等が好ましい溶媒として挙げられる。また、溶媒を用いなくとも良い。本発明の中間体と生体関連物質を反応溶媒に加える順番はどちらが先でも良い。反応温度は、生体関連物質の活性が失われない温度であれば特に限定されないが、タンパク質、ポリペプチドを反応させる場合は、好ましくは0～40℃であり、抗癌剤、抗真菌剤、リン脂質を反応させる場合は、好ましくは-20～150℃である。反応時間は0.5～72時間が好ましく、更に好ましくは、1～24時間である。反応に際しては、N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(EDC)等の縮合

剤を用いても良い。この反応を行うことで、生体関連物質と本発明の中間体との間に共有結合が形成されるが、(a)、(k)を用いた場合はアミド結合、(b)を用いた場合は2級アミノ基、(d)、(h)、(i)を用いた場合はウレタン結合、(f)を用いた場合はシッフ塩基形成される。シッフ塩基が形成される場合は、これをシアノ水素化ホウ酸ナトリウム等の還元剤を用いて還元処理を行い、2級アミノ基を形成させても良い。反応後は、透析、塩析、限外ろ過、イオン交換クロマトグラフィー、電気泳動、抽出、再結晶、吸着処理、再沈殿、カラムクロマトグラフィー、超臨界抽出等の精製手段にて精製してもよい。

(生体関連物質のメルカプト基と本発明の中間体を反応させる場合)

生体関連物質のメルカプト基を用いて修飾する場合、本発明の中間体(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(h)、(i)、(k)を用いるが、より好ましくは、(e)を用いる。反応溶媒、反応条件等は、アミノ基を用いる場合と同じである。反応に際しては、ヨウ素やAIBNの様なラジカル発生剤を用いてもよい。この反応を行うことで、生体関連物質と本発明の中間体との間に共有結合が形成されるが、(a)、(k)を用いる場合はチオエステル結合が、(d)、(h)、(i)を用いた場合はチオカーボネート結合が、(c)を用いた場合はジスルフィド結合が、(b)、(e)、(f)を用いた場合はスルフィド結合が形成される。

(生体関連物質の不飽和結合と本発明の中間体を反応させる場合)

生体関連物質の不飽和結合を用いて修飾する場合、本発明の中間体(c)を用いる。反応溶媒、反応条件等は、アミノ基を用いる場合と同じである。反応に際しては、ヨウ素やAIBNの様なラジカル発生剤を用いてもよい。この反応を行うことで、生体関連物質と本発明の中間体との間にスルフィド結合が形成される。

(生体関連物質のカルボキシル基と本発明の中間体を反応させる場合)

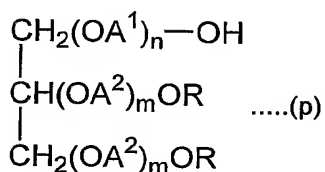
生体関連物質のカルボキシル基を用いて修飾する場合、本発明の中間体(c)、(g)、(j)を用いる。反応溶媒、反応条件等は、アミノ基を用いる場合と同じである。反応に際しては、適宜DCC、EDC等の縮合剤を用いても良い。この反応を行うことで、生体関連物質と本発明の中間体との間に共有結合が形成されるが、(c)を用いる場合はチオエステル結合が、(g)、(j)を用

いる場合はアミド結合が形成される。

また、生体関連物質にアミノ基、メルカプト基、不飽和結合、カルボキシル基が無い場合も、適宜生体関連物質に反応性基を導入し、本発明の中間体を用いて修飾させることができる。

(中間体の製造)

本発明の中間体は、例えば次のようにして製造することができる。2, 2-ジメチルー1, 3-ジオキソラン-4-メタノールの1級水酸基残基へ、アルキレンオキシドを0~1000モル重合させ、末端水酸基をベンジル基や t-Bu 基で保護した後、酸性条件にて環状アセタール構造を脱保護し、新たに生成した2個の水酸基へアルキレンオキシドを10~1000モル重合させ、末端をアルキルエーテル化する。次いで、ベンジル基や t-Bu 基等の保護基を脱保護し、下記一般式 (p) の化合物を得ることができる。nが0の場合は、2, 2-ジメチルー1, 3-ジオキソラン-4-メタノールの1級水酸基残基をベンジル基や t-Bu 基で保護した後、酸性条件にて環状アセタール構造を脱保護し、新たに生成した2個の水酸基へアルキレンオキシドを10~1000モル重合させ、末端をアルキルエーテル化する。次いで、ベンジル基や t-Bu 基等の保護基を脱保護し、下記一般式 (p) の化合物を得ることができる。



また、化合物 (p) は次のような方法でも製造することができる。2, 2-ジメチルー1, 3-ジオキソラン-4-メタノールの1級水酸基をベンジル基や t-Bu 基で保護した後、酸性条件にて環状アセタール構造を脱保護し、新たに生成した2個の水酸基へアルキレンオキシドを10~1000モル重合させ、末端をアルキルエーテル化し、次いで、ベンジル基や t-Bu 基等の保護基を脱保護し、n=0の化合物 (p) を得る。新たに生成した水酸基へアルキレンオキシドを0~1000モル重合させても得ることができる。

nが1~3の場合は、2, 2-ジメチルー1, 3-ジオキソラン-4-メタノールと2-ベンジルオキシエタノール (n=1) やジエチレングリコールベンジルエーテル (n=2) 、ト

リエチレングリコールベンジルエーテル ($n = 3$) をカップリングした後、酸性条件にて環状アセタール構造を脱保護し、新たに生成した 2 個の水酸基へアルキレンオキシドを 10 ~ 1000 モル重合させ、末端をアルキルエーテル化する。次いで、ベンジル基や t-Bu 基等の保護基を脱保護し、一般式 (p) の化合物を得ることができる。

この様に、アルキレンオキシド付加重合反応を用いることで、高収率で、かつカラム精製することなく、工業的に適した方法で、高純度の分岐型ポリアルキレングリコール誘導体を製造することができる。

このようにして得られた化合物 (p) の水酸基を用いて、群 (I)、群 (II) に示した各種反応性基へ変性させることで本発明の中間体を製造することができる。更には、生成した反応性基を用いて、各種生体関連物質を反応、修飾させ、本発明の修飾された生体関連物質を製造することができる。

また、群 (I)、群 (I I) の各官能基を有する中間体は、生体関連物質と反応させることができるが、場合によってはこれらの中間体を更に他の化合物と反応させて他の中間体を製造し、この他の中間体を生体関連物質と反応させることができる。例えば、群 (I I) に属する (g) (j) (k) の官能基を有する中間体を原料とし、群 (I) の (a) (e) (f) の中間体を合成することができる。

2, 2-ジメチル-1, 3-ジオキソラン-4-メタノールの 1 級水酸基残基へのアルキレンオキシド付加重合は次のような方法で製造することができる。トルエンもしくは無溶媒中、金属ナトリウムや金属カリウム、水素化ナトリウム、水素化カリウム、ナトリウムメトキシド、カリウム-*t*-ブトキシド等のアルカリ条件下、オキシアルキレンを付加重合させて得ることができる。 $n = 1 \sim 3$ の場合はこのアルキレンオキシド付加重合工程は行わなくて良い。続くベンジルエーテル化は、次のような方法で製造することができる。

1) 非プロトン性溶媒もしくは無溶媒中、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム等のアルカリ触媒存在下、ベンジルクロリドまたはベンジルブロマイドと、2, 2-ジメチル-1, 3-ジオキソラン-4-メタノールまたはそのアルキレンオキシド付加物を反応させて得ることがで

きる。

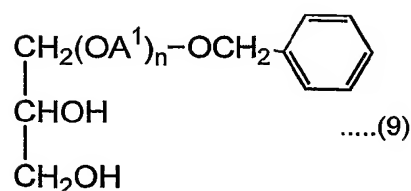
2) 非プロトン性溶媒もしくは無溶媒中、2, 2-ジメチル-1, 3-ジオキソラン-4-メタノール及びまたはそのアルキレンオキシド付加物の水酸基を金属ナトリウム、金属カリウム、水素化ナトリウム、水素化カリウム、ナトリウムメトキシド、カリウムメトキシド、カリウム-*t*-ブトキシド等を用いてアルコラート化させ、塩基性条件下、ベンジルクロリドまたはベンジルブロマイドと反応させて得ることができる。

3) 非プロトン性溶媒もしくは無溶媒中、2, 2-ジメチル-1, 3-ジオキソラン-4-メタノール及びまたはそのアルキレンオキシド付加物の水酸基をメタンスルホン酸クロリドや *p*-トルエンスルホン酸クロリド、2, 2, 2-トリフルオロエタンスルホン酸クロリド等で活性化させ、ベンジルアルコールのアルコラートと反応させて得ることができる。

4) 非プロトン性溶媒もしくは無溶媒中、2-ベンジルオキシエタノール ($n=1$) やジエチレングリコールベンジルエーテル ($n=2$)、トリエチレングリコールベンジルエーテル ($n=3$) の水酸基をメタンスルホン酸クロリドや *p*-トルエンスルホン酸クロリド、2, 2, 2-トリフルオロエタンスルホン酸クロリド等で活性化させ、2, 2-ジメチル-1, 3-ジオキソラン-4-メタノールのアルコラートと反応させて得ることができる。

ベンジルエーテル化に続く環状アセタール構造の脱保護は、酢酸、リン酸、硫酸、塩酸等の酸にて pH 1~4 に調整した水溶液中で反応させ、式 (9) の化合物を製造することができる。

環状アセタール構造の脱保護により新たに生成した 2 個の水酸基を有する下記式 (9) へのアルキレンオキシド付加重合は、特に制限されないが、以下の工程 (C1)、工程 (C2) を経ることで製造することができる。



工程（C1）：式（9）の化合物をアルコール化する方法としては、触媒として金属ナトリウム又は金属カリウムを用い、好適には金属ナトリウムを用い、触媒量を5～50モル%、10～50℃で溶解させる

工程（C2）：50～130℃の反応温度でアルキレンオキシド付加重合する。

工程（C1）における触媒量については、5モル%未満だとアルキレンオキシドの重合反応速度が遅くなり、熱履歴が増して末端ビニルエーテル体等の不純物が生じるため、5モル%以上とすることが高品質の高分子量体を製造する上で有利である。触媒が50モル%を超えると、アルコール化反応の際に反応液の粘性が高まり、あるいは固化してしまい、攪拌効率が低下し、アルコール化が促進されない傾向がある。また固化した場合はハンドリングがしにくくなる傾向があり、吸湿の原因となる。アルコール化物が吸湿してしまうと、水分由来のポリアルキレングリコール体が生成し、医薬品用途としては望ましくない不純物として混入してしまう。

溶解時の温度が50℃より高いと、分解反応がおき、ベンジルアルコールやグリセリンが生成する。ベンジルアルコールが生成した場合、目的物と同様にアルキレンオキシドとの付加重合が起き、目的物の0.5倍の分子量を有する低分子量不純物が生成する。ベンジルアルコール由来の低分子量不純物が生成した場合は、目的物と同様に次工程の水酸基のアルキルエーテル化工程、脱保護工程を経て官能基導入されるので、生体関連物質と反応可能な低分子量不純物となる。このような不純物は生体関連物質と反応し、製剤の物性を変化させる可能性がある。また、グリセリンが生成した場合も同様に、アルキレンオキシドとの付加重合が起き、目的物の1.5倍の分子量を有する高分子量不純物が生成する。この高分子量不純物は、ベンジル基がなく、末端水酸基がアルキルエーテル化されるのみであるため、官能基を有することはないが、このような不純物を含んだまま薬剤等との結合を行うと、得られる薬剤は不均一なものとなり、品質にバラツキが生ずる傾向がある。また高純度品が求められる医薬品用途には望ましくない。

10℃より低い温度で溶解する場合、触媒量が50モル%より多い場合と同様、アルコール化反応の際に反応液の粘性が高まり、あるいは固化してしまい、ハンドリングしにくくなる

傾向があり、また吸湿の原因となる。

反応溶媒については、トルエン、ベンゼン、キシレン、アセトニトリル、酢酸エチル、テトラヒドロフラン、クロロホルム、塩化メチレン、ジメチルスルホキシド、ジメチルホルムアミド、ジメチルアセトアミド等の非プロトン性溶媒であれば特に制限はないが、トルエンあるいは無溶媒が好ましい。反応時間については、1～24時間が好ましい。1時間より短いと触媒が完全に溶解しない恐れがある。24時間より長いと、前述の分解反応が起きる恐れがある。

工程（C2）における反応温度については、50℃より低いと、重合反応の速度が遅く、熱履歴が増すことで、式（5）の化合物の品質が低下する傾向がある。また、130℃より高いと、重合中に末端のビニルエーテル化等の副反応が起き、目的物の品質が低下する傾向がある。重合中、分子量が大きくなるにつれ、反応液の粘度が上がるため、適宜非プロトン性溶剤、好適にはトルエンを加えても良い。

アルコラート化の工程における、もう一つの製造方法としては、下記工程（C3）が挙げられる。

工程（C3）：触媒としてナトリウムメトキシド、カリウムターブトキシド又はカリウムメトキシドを、更に好適にはナトリウムメトキシドを5～50モル%の量添加し、60～80℃で反応させる。このとき、より交換反応がおきやすいように、減圧操作を行っても良い。

触媒量については前述の通りの理由で5～50モル%の量が好ましい。反応温度については、60℃より低いと、交換反応の反応率が低下し、メタノール等のアルコールが残存し、アルキレンオキシドの付加重合を経て、目的物の0.5倍の分子量を有する不純物が生成する。80℃より高いと分解反応が起きる。このアルコラート化反応は温度を上げる必要があり、分解反応がおきやすいため、反応時間は1～3時間とするのが望ましい。1時間より短いとアルコラート化反応率が低くなる恐れがある。また3時間より長いと、分解反応が起きる恐れがある。反応溶媒においては、非プロトン性溶媒であれば特に制限はないが、好ましくはトルエン、あるいは無溶媒である。

続く末端のアルキルエーテル化は、下記に（1）、（2）いずれでもよい。

(1) ポリアルキレングリコール鎖末端をアルコラート化させ、ハロゲン化アルキルと反応させる方法

(2) ポリアルキレングリコール鎖末端水酸基をメタンスルホン酸クロリドや p-トルエンスルホン酸クロリド、2, 2, 2-トリフルオロエタンスルホン酸クロリド等で活性化させ、アルキルアルコールのアルコラートと反応させる方法

好適には(2)の方法であり、以下に、より詳細に説明する。

(2)の製造方法は下記工程(B1)、工程(B2)、工程(B3)よりなる。

工程(B1)：式(5)で示される化合物に対し、脱ハロゲン剤、式(6)で示される化合物を加え、20～60℃において反応させ、式(7)の化合物を得る工程。このとき、各々の仕込みモル比は下記関係を満足する。

$$V_c \geq 3 V_a$$

$$V_b > V_c$$

Va：式(5)で示される化合物のモル数

Vb：脱ハロゲン剤のモル数

Vc：式(6)で示される化合物のモル数

より好ましくは、

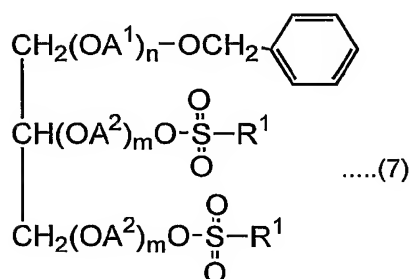
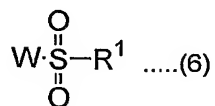
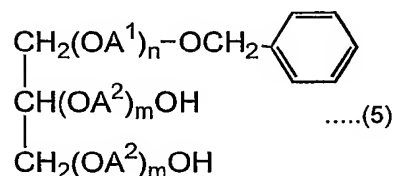
$$20 V_a \geq V_c \geq 3 V_a$$

$$4 V_c > V_b > V_c$$

なる関係を満足する場合である。

ここで $V_c < 3 V_a$ であると、反応率が低くなりオキシアルキレン鎖末端に水酸基が残存してしまう。残存水酸基は後工程で官能基導入され、目的物と同分子量の多官能性不純物となる。このような多官能不純物が存在すると、生体関連物質との結合の際に架橋剤として働き、修飾された生体関連物質の純度が低下する傾向がある。また $V_b \leq V_c$ となると、反応の進行に伴って副生する酸を効率よくトラップできないために反応率が低くなり、オキシアルキレン鎖末端に水酸基が残存してしまう。また、 $V_c > 20 V_a$ 、 $V_b \geq 4 V_c$ である場合は、過剰量分

が後工程へ混入し、副反応の原因となりうる。



使用する脱ハロゲン剤としては、トリエチルアミン、ピリジン、4-ジメチルアミノピリジン等の有機塩基、もしくは炭酸ナトリウム、水酸化ナトリウム、炭酸水素ナトリウム、酢酸ナトリウム、炭酸カリウム、水酸化カリウム等の無機塩基が挙げられるが、好ましい脱塩酸剤はトリエチルアミン、ピリジン、4-ジメチルアミノピリジン等の有機塩基である。

また、使用する式(6)の化合物においては、WがC l、Brが好ましく、又R¹はメチル基、フェニル基、p-メチルフェニル基の場合が好ましいが、更に好適にはWがC lでR¹がメチル基であるメタンスルホニルクロリドが最も好ましい。

このときに使用する溶剤としては、非プロトン性溶剤であれば特に制限されないが、好ましくはトルエン、ベンゼン、キシレン、アセトニトリル、酢酸エチル、テトラヒドロフラン、クロロホルム、塩化メチレン、ジメチルスルホキシド、ジメチルホルムアミド、ジメチルアセトアミド等が挙げられ、更に好ましくは、反応系中水分を共沸脱水除去できるトルエンである。反応時の使用溶剂量については、式(5)の化合物に対して0.5倍重量から10倍重量が好

ましい。式（５）の分子量が大きい場合は反応液の粘度が高くなり、反応率が低下するために溶剤で希釈したほうが好ましい。

反応温度については、特に制限されないが、副反応を抑制するためには 60℃以下が好ましく、また反応液の粘度上昇を抑制する意味で 20℃以上が好ましい。反応時間については 1～24 時間が好ましい。1 時間より短いと、反応率が低い恐れがある。24 時間より長いと、副反応が起こる恐れがある。

反応に際しては、反応前に共沸脱水等の原料脱水操作を行っても良い。また、2,6-Di-tert-butyl-p-cresol 等の酸化防止剤を加えても良い。また、反応が進行し、式（７）の化合物が生成するのに伴い、塩が生成するが、反応終了後にそのまま次の工程に進んでも良いし、ろ過にて塩を除いても良いし、ろ過後に抽出、再結晶、吸着処理、再沈殿、カラムクロマトグラフィー、超臨界抽出等の精製手段にて式（７）の化合物を精製してもよい。

工程（Ｂ２）：式（７）の化合物に、式（８）で示される化合物を加え、20～80℃において反応させて式（４）の化合物を得る工程。このとき、各々の仕込みモル比は下記関係を満足する。

$$V_d > V_c$$

V_d ：式（８）で示される化合物のモル数

より好ましくは、

$$10V_c > V_d > V_c$$

なる関係を満足する場合である。



式（８）において、Rは前述の通りであり、Mはナトリウムまたはカリウムであり、好適にはナトリウムである。

ここで、 $V_d \leq V_c$ であると、アルキルエーテル化反応十分に進行せず、オキシアルキレン

鎖末端にメシレート基のような反応性基が残存することになる。オキシアルキレン鎖末端に反応性基が残存した場合、前述同様、多官能化合物となり、生体関連物質との結合時に重大な副反応を引き起こす。また、 $V_d \geq 10 V_c$ であった場合、過剰のアルコラートが後工程に混入し、副反応等を引き起こす原因となりうる。

この反応で使用する溶剤としては、前述の非プロトン性溶剤であれば特に制限されないが、好ましくはトルエンである。反応時の使用溶剤量については式（７）の化合物に対して 0.5 倍から 10 倍量が好ましい。式（７）の分子量が大きい場合は反応液の粘度が高くなるために溶剤で希釈したほうが好ましい。

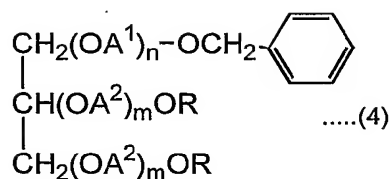
反応温度については、特に制限されないが、副反応の抑制するためには 80℃以下が好ましく、また反応液の粘性上昇を抑制する意味で 20℃以上が好ましい。反応時間については 1～24 時間が好ましい。1 時間より短いと反応率が低い恐れがある。24 時間より長いと、副反応が起こる恐れがある。反応に際しては、反応前に共沸脱水等の原料脱水操作を行っても良い。

工程（B3）：反応液をろ過、又は反応液を 10 重量%以上の濃度の無機塩水溶液で水洗する工程。

ここで、無機塩については、特に種類は制限されないが、好適には食塩である。濃度については、10 重量%より少ないと、目的物が水層へ移行し、著しく歩留まりを落とす。この水洗操作は複数回繰り返しても良い。この工程（B3）は、過剰に添加した原料や副生した塩等除去するためであり、この工程を省略すると、次に工程（B1）～工程（B3）を再度行う場合は、副反応の原因となる恐れがある。次工程として脱ベンジル工程を行う場合は、これらの不純物が触媒毒となり、反応率に影響を及ぼす恐れがある。

また、オキシアルキレン鎖末端のアルキルエーテル化率を高めるため、工程（B1）～工程（B3）を再度繰り返して行うことが好ましい。オキシアルキレン鎖末端のアルキルエーテル化率が低いと、前述のように多官能の不純物が生成する恐れがある。

このようにして得られた式（４）の化合物は、抽出、再結晶、吸着処理、再沈殿、カラムクロマトグラフィー、超臨界抽出等の精製手段にて精製してもよい。



続く脱ベンジル化による化合物（p）の製造は、特に制限されないが、水素化還元触媒、水素供与体を用い、次の工程（A）の水添反応にて製造することができる。

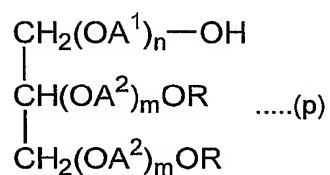
工程（A）： 式（4）の化合物を、反応系中の水分量を1%以下の条件で水素化還元反応させる工程。反応系中の水分量が1%より多いと、ポリオキシアルキレン鎖の分解反応がおきる。分解生成したポリアルキレングリコールは水酸基を有するため、次工程にて官能基化され、反応性の低分子量不純物となる。このような反応性低分子量不純物は、前述のように生体関連物質と反応し、製剤の物性を変化させる傾向がある。

水素化還元触媒としては、パラジウムが好ましい。担体については特に制限されないが、好ましくはアルミナ、カーボンであり、更に好適にはカーボンである。パラジウム量としては、式（4）の化合物に対して1～20重量%が好ましい。1重量%より少ないと、脱保護反応率が低くなり、次工程での官能基化率が低くなる恐れがある。また、20重量%より多いと、ポリアルキレングリコール鎖の分解反応が起き、前述の反応性低分子量体が副生する恐れがある。反応溶媒については、反応系中水分量が1%より少なくなれば特に制限されないが、好ましくはメタノール、エタノール、2-プロパノール等が挙げられ、更に好ましくはメタノールである。水素供与体については、特に制限されないが、水素ガス、シクロヘキセン、2-プロパノール等が挙げられる。反応温度については、40℃以下が好ましく、40℃より高いとポリアルキレングリコール鎖の分解反応が起こり、反応性低分子量体が生成する恐れがある。反応時間については、特に制限はなく、触媒量が多いと短時間で反応が終了し、触媒量が少ないと長時間要するが、1～5時間が好ましい。1時間より短いと反応率が低い恐れがある。5時間より長いと、ポリアルキレングリコール鎖の分解反応が起こる恐れがある。

得られた式（p）の化合物は、抽出、再結晶、吸着処理、再沈殿、カラムクロマトグラフィ

一、超臨界抽出等の精製手段にて精製してもよい。

このようにして得られた化合物は、下記式 (p) で表わされ、実質的に 2 級水酸基を含まない、ポリアルキレングリコール誘導体である。



(式中、R は炭素数 1 ～ 24 の炭化水素基であり、 OA^1 、 OA^2 は炭素数 2 ～ 4 のオキシアルキレン基であり、R、 OA^2 は一分子中で互いに同一または異なっており、n および m は前記オキシアルキレン基の平均付加モル数であり、n は 0 ～ 1000 を示し、m は 10 ～ 1000 を示す。)

式 (p) の化合物は、実質的に 2 級水酸基を含まないので、次の官能基導入反応の反応率が高く、高純度のポリアルキレングリコール誘導体を得ることができる。2 級水酸基がある場合、官能基導入の反応率が低く、修飾された生体関連物質の中間体純度が低くなり、薬剤等に不純物が混入し、問題となる可能性がある。

本発明の式 (p) の化合物は、式 (p) のポリアルキレングリコール誘導体のゲル浸透クロマトグラフィーより得られる、ピーク頂点に相当する分子量を M_p とし、2 位と 3 位のポリオキシアルキレン鎖末端において、アルキル基 R に含まれる残存水酸基の割合を H_{rd} としたとき、

$$H_{rd} / M_p \times 1000000 \leq 3$$

なる関係を満足する。より好ましくは、

$$H_{rd} \div M_p \times 1000000 \leq 2$$

なる関係を満足する。

M_p は、ゲル浸透クロマトグラフィーに使用した展開溶媒などに起因するピークや、使用したカラムや装置に起因するベースラインの揺らぎによる擬似ピークを除いたピークの内、屈折率

最大点の重量平均分子量を示す。本発明において、ゲル浸透クロマトグラフィーは、GPCシステムとしてはSHODEX GPC SYSTEM-11を用い、下記条件にて測定を行った。

展開溶媒：テトラヒドロフラン 流速：1 ml/min カラム：SHODEX KF-801, KF-803, KF-804 (I.D. 8mm X 30cm) カラム温度：40℃ 検出器：RI X 8 サンプル量：1mg/g, 100ul

アルキル基Rに含まれる残存水酸基の割合 H_{rd} は、脱保護する前の前駆体である式(4)の化合物をメシル化して測定する。以下にRがメチル基の場合を例示する。

式(4)の化合物V e グラムに5 V e グラムのトルエンを加え、常圧にて還流脱水を行う。40℃に冷却後、式(4)の化合物1モルに対し、トリエチルアミン20モルを加え、よく攪拌後、メタンスルホンクロリド6モルを添加する。このとき、トルエン希釈、あるいは無希釈で滴下して添加するのが望ましい。そのまま40℃で反応を3時間行い、ろ過にてメタンスルホン酸のトリエチルアミン塩を除き、ろ液に10 V e ~ 20 V e グラムの酢酸エチルを加え、室温まで冷却後、ヘキサンを結晶が析出するまで徐々に加える。得られた結晶を濾取し、結晶に再度10 V e ~ 20 V e グラムの酢酸エチルを加え、加温溶解し、室温まで冷却後、ヘキサンを結晶が析出するまで徐々に加える。結晶を濾取、乾燥し、得られた乾燥物20 mgを重クロロホルムに溶解し、 1H 核磁気共鳴スペクトルを測定する。TMS基準ピークを0 ppmとしたとき、3.38 ppmに検出されるオキシアルキレン鎖末端のメチル基ピーク積分値 M_{me} と、3.08 ppmに検出されるオキシアルキレン鎖末端に残存した水酸基がメシル化された際のメシル基ピークの積分値 M_{ms} としたとき、 H_{rd} は以下の関係で示される。

$$H_{rd} = M_{ms} / (M_{ms} + M_{me})$$

Rがメチル基以外の基である場合は、適宜アルキル基の検出されるピーク位置を同定し、プロトン数を加味し、同様の式から求めることができる。

このようにして求めた H_{rd} が、

$$H_{rd} / M_p \times 1000000 > 3$$

であった場合、2位と3位のポリオキシアルキレン鎖末端に水酸基が残存する不純物が多量に混入していることを意味する。このような不純物があった場合、後工程でポリオキシアルキレ

ン鎖末端の水酸基も官能基導入され、多官能の不純物が生成することとなる。このような不純物は前述のように生体関連物質との結合の際、架橋剤として作用し、副反応を引き起こす恐れがある。

本発明の式 (p) の化合物は、ゲル浸透クロマトグラフィー測定を行った際、溶出開始点から溶出終了点までの全ピークにおける多分散度 M_w/M_n が、

$$M_w/M_n \leq 1.07$$

なる関係を満足する。より好ましくは、

$$M_w/M_n \leq 1.05$$

を満足する場合である。

$M_w/M_n > 1.07$ である場合、前述の高分子量不純物や低分子量不純物が多いことを意味し、生体関連物質と結合させる際、副反応物が多くなり、純度不十分となる恐れがある。また、純度不十分となった場合、医薬品として副作用を引き起こす恐れがある。

本発明の式 (p) の化合物は、メタンスルホニルクロリドを反応させてメシル化物を得、重メタノール溶液で ^1H 核磁気共鳴スペクトルを得た際、 3.13 ppm 付近に検出される $n=0$ の場合のグリセロール骨格に直接結合した 1 位の水酸基から誘導されたメシル基由来のメチル基積分値 M_1 と、 3.12 ppm 付近に検出されるポリアルキレングリコール鎖の水酸基から誘導されたメシル基由来のメチル基積分値 M_2 が、

$$M_2 / (M_1 + M_2) \times 100 \leq 10$$

なる関係を満足する。より好ましくは

$$M_2 / (M_1 + M_2) \times 100 \leq 8$$

なる関係を満足する。

以下に M_1 、 M_2 の算出方法を例示する。

式 (p) の化合物 $V \text{ f}$ グラムに $4 V \text{ f}$ グラムのトルエンを加え、常圧にて還流脱水を行う。 40°C に冷却後、式 (p) の化合物 1 モルに対し、トリエチルアミン 20 モルを加え、よく攪拌後、メタンスルホニルクロリド 6 モルを添加する。このとき、トルエン希釈、あるいは無希

釈で滴下して添加するのが望ましい。そのまま 40℃で反応を 3 時間行い、ろ過にてメタンスルホン酸のトリエチルアミン塩を除き、ろ液に 10 V f ~ 20 V f グラムの酢酸エチルを加え、室温まで冷却後、ヘキサンを結晶が析出するまで徐々に加える。得られた結晶を濾取し、結晶に再度 10 V f ~ 20 V f グラムの酢酸エチルを加え、加温溶解し、室温まで冷却後、ヘキサンを結晶が析出するまで徐々に加える。結晶を濾取、乾燥し、得られた乾燥物 20 mg を重メタノールに溶解し、¹H 核磁気共鳴スペクトルを測定する。TMS 基準ピークを 0 ppm とし、3.13 ppm に検出される n = 0 の場合のグリセロール骨格に直接結合した 1 位の水酸基から誘導されたメシル基由来のメチル基積分値 M1 とする。また、3.12 ppm に検出されるオキシアルキレン鎖末端、または分解生成したポリアルキレングリコール鎖から誘導されたメシル基由来のメチル基積分値を M2 として求めることができる。

このようにして求めた M1, M2 から誘導される

$M2 / (M1 + M2) \times 100 > 10$ の場合、下記に示す不純物が多量に混入するため、修飾された生体関連物質の純度が低下する傾向がある。

(A) : 式 (9) の化合物のアルコール化の際、分解反応が起き、生成したベンジルアルコールにアルキレンオキシドが付加重合し、後工程でベンジル基が脱保護されて生成する、化合物 (p) の 0.5 倍分子量の水酸基を有する不純物

(B) : (5) の化合物のアルキルエーテル化の際に生成する、2 位、あるいは 3 位に水酸基が残存した化合物 (p) と同分子量の不純物

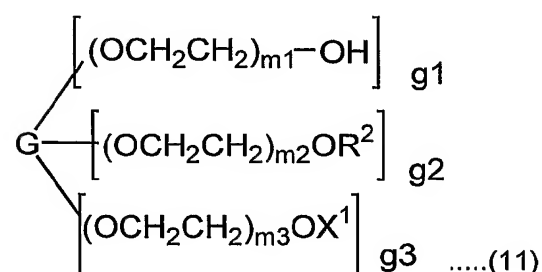
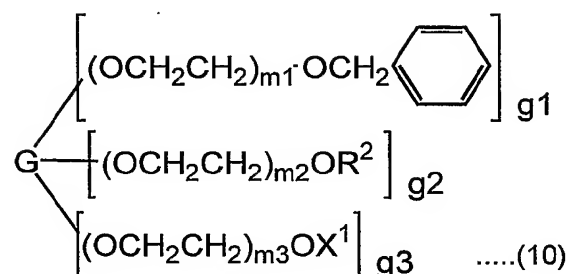
(C) : (4) の化合物の脱ベンジル化の際、ポリオキシアルキレン鎖が分解して生成する低分子量の水酸基を有する不純物

等の不純物に由来する、ポリオキシアルキレン鎖末端に水酸基を有する不純物の量が多いことを意味する。

本発明の脱ベンジル反応は、他の誘導体に広く適用できるものである。

より具体的には、下記工程 (AA) を有することを特徴とする、式 (11) のポリエチレングリコール誘導体の製造方法である。

工程（AA）：式（10）で示される化合物を、反応系中の水分量を1%以下の条件で水素化還元反応させる工程



（式中、G は2～4個の水酸基を有する化合物の残基であり、R²は炭素数1～4の炭化水素基である。m₁、m₂、m₃はオキシエチレン基の平均付加モル数であり、下記関係を満たす。

$$0 \leq m_1 \leq 1000, \quad 0 \leq m_2 \leq 1000, \quad 0 \leq m_3 \leq 1000, \quad 10 \leq m_1 + m_2 + m_3 \leq 1000$$

X¹はアミノ基、カルボキシル基、あるいはそれらの保護基である。g₁、g₂、g₃は各々整数を表わし、下記関係式を満たす。

$$1 \leq g_1 \leq 3, \quad 0 \leq g_2, \quad 0 \leq g_3, \quad 2 \leq g_1 + g_2 + g_3 \leq 4$$

Gにおける、より具体的な2～4個の水酸基を有する化合物残基としては、エチレングリコール、グリセリン、ペンタエリスリトール、ジグリセリン等が挙げられ、より好ましくはエチレングリコール、グリセリンの場合である。

より具体的なR²としては、メチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、t-ブチル基、等が挙げられるが、好ましくはメチル基の場合である。

m_1 、 m_2 、 m_3 については、

$0 \leq m_1 \leq 1000$ 、 $0 \leq m_2 \leq 1000$ 、 $0 \leq m_3 \leq 1000$ 、 $10 \leq m_1 + m_2 + m_3 \leq 1000$ であれば特に制限されないが、より好ましくは、 $20 \leq m_1 + m_2 + m_3 \leq 1000$ の場合であり、更に好ましくは、 $40 \leq m_1 + m_2 + m_3 \leq 1000$ 、の場合であり、最も好ましくは $100 \leq m_1 + m_2 + m_3 \leq 1000$ の場合である。

具体的な X^1 としては、アミノ基、Bocアミノ基、Fmocアミノ基、カルボキシル基等が挙げられ、より好ましくはBocアミノ基である。Bocはt-ブトキシカルボニル基を示し、Fmocは9-フルオレニルメトキシカルボニル基を示す。

反応系中の水分、触媒量、反応時間、溶媒等は前述の工程(A)の通りである。水素化還元反応は、水素化還元触媒を用いて行うことができる。水素化還元触媒としてはパラジウムが好ましい。

本発明のアルキルエーテル化反応は、他の誘導体に広く適用できるものである。

より具体的には、下記に示す工程(BB1)～工程(BB3)を行う式(16)で示されるポリエチレングリコール誘導体の製造方法である。

工程(BB1)：式(12)で示される化合物に対し、脱ハロゲン剤、式(14)で示される化合物を加え、 $20 \sim 60^\circ\text{C}$ で反応させ、式(13)の化合物を得る工程。このとき、各々の仕込みモル比は下記関係を満足する。

$$V_j \geq 1.5 \times V_h \times g_5$$

$$V_i > V_j$$

V_h ：式(12)で示される化合物のモル数

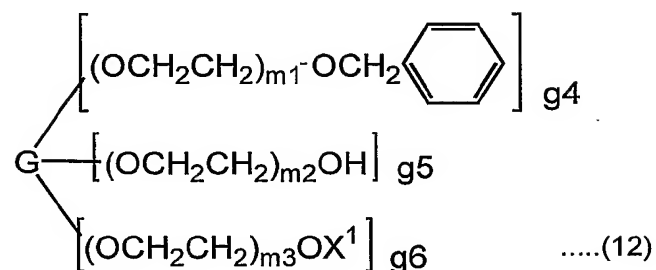
V_i ：脱ハロゲン剤のモル数

V_j ：式(14)で示される化合物のモル数

工程(BB2)：式(13)の化合物に、式(15)で示される化合物を加え、 $20 \sim 80^\circ\text{C}$ において反応させて式(16)の化合物を得る工程。このとき、各々の仕込みモル比は下記関係を満足する。

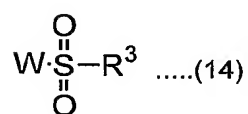
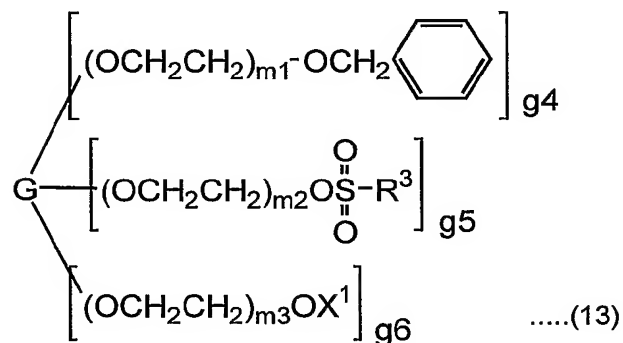
$$V_k > V_j$$

V_k : 式 (15) で示される化合物のモル数



(式中、G、 m_1 、 m_2 、 m_3 、 X^1 は上記に同じである。 g_4 、 g_5 、 g_6 は各々整数を表わし、下記関係式を満たす。

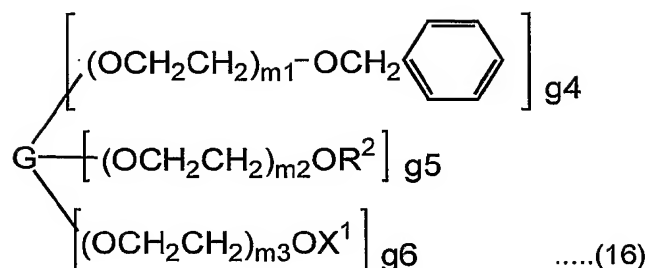
$$0 \leq g_4, \quad 1 \leq g_5 \leq 3, \quad 0 \leq g_6, \quad 2 \leq g_4 + g_5 + g_6 \leq 4)$$



(式中、G、 m_1 、 m_2 、 m_3 、 X^1 は上記に同じである。WはCl、Br、Iから選択されるハロゲン原子である。 R^3 は炭素数1～10の炭化水素基である。)



(式中、 R^2 は上記に同じである。Mはカリウムまたはナトリウムである。)



(G, R², m₁, m₂, m₃, X¹については、上記に同じである。)

工程 (BB3) : 反応液をろ過、又は反応液を 10 重量%以上の濃度の無機塩水溶液で水洗する工程。

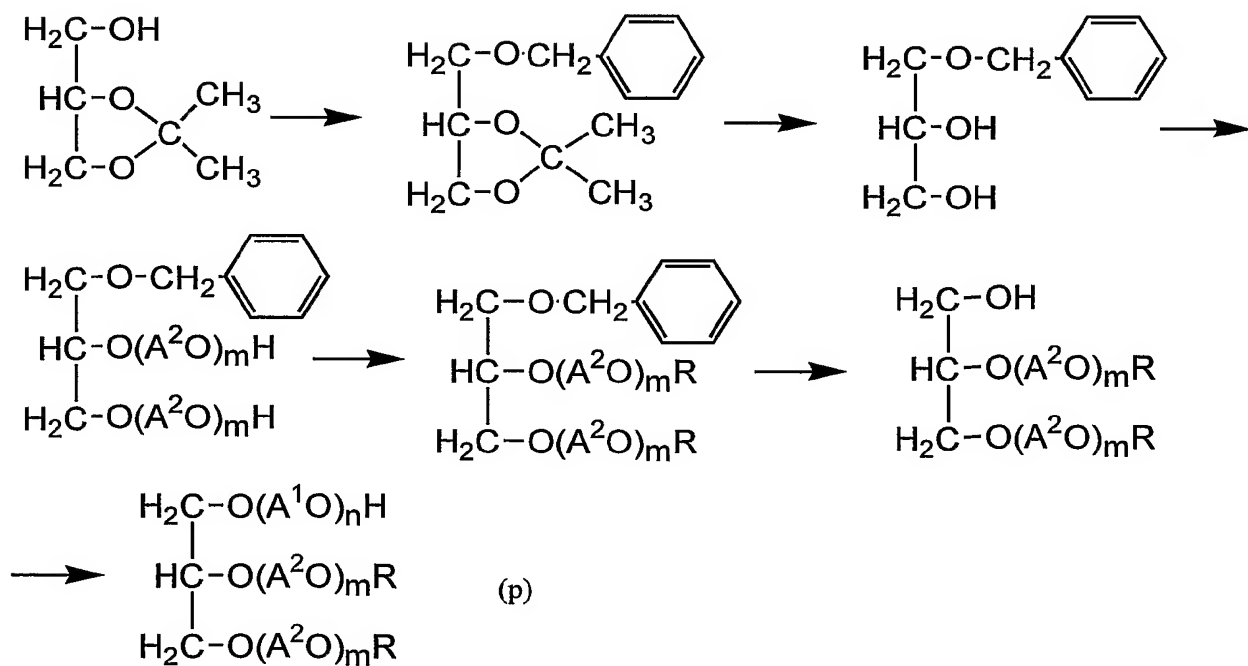
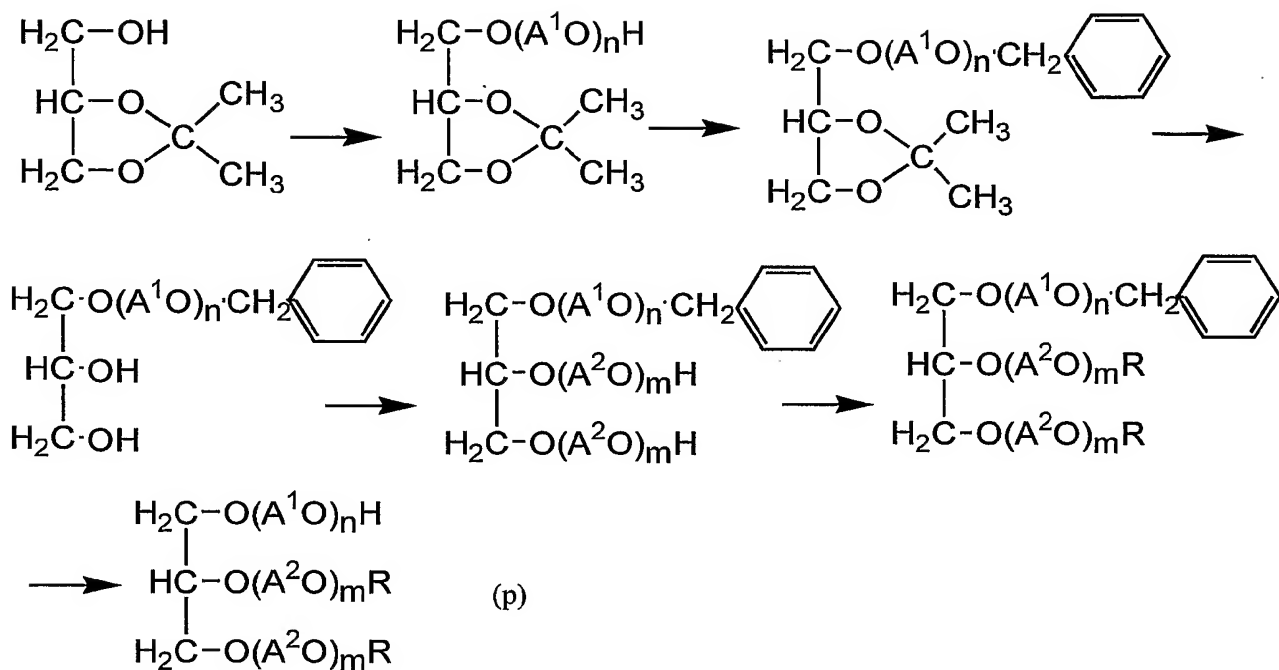
式 (14) の化合物においては、WがC1、Brが好ましく、又R³はメチル基、フェニル基、p-メチルフェニル基の場合が好ましいが、更に好適にはWがC1でR³がメチル基であるメタンスルホニルクロリドが最も好ましい。

無機塩については、特に種類は制限されないが、好適には食塩である。

また、前述の理由で、オキシエチレン鎖末端のアルキルエーテル化率を高めるため、工程 (BB1) ~ 工程 (BB3) を再度繰り返して行うことが好ましい。

反応系中の水分、触媒量、反応時間、溶媒等は、前述の工程 (B1) ~ (B3) の通りである。

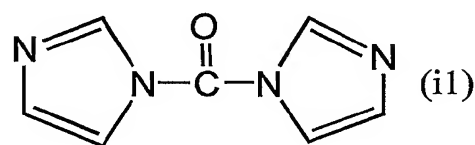
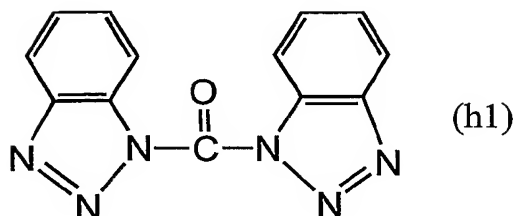
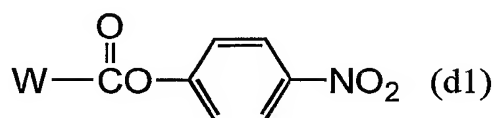
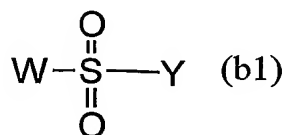
化合物(P)の反応経路を下記に示す。



続いて、脱ベンジル化反応により生成した化合物(p)の水酸基への反応性基の導入について説明する。

((b)、(d)、(h)、(i) の製造方法)

化合物 (p) とトルエン、ベンゼン、キシレン、アセトニトリル、酢酸エチル、ジエチルエーテル、t-ブチルメチルエーテル、テトラヒドロフラン、クロロホルム、塩化メチレン、ジメチルスルホキシド、ジメチルホルムアミド、ジメチルアセトアミド等の非プロトン性溶媒、もしくは無溶媒中、トリエチルアミン、ピリジン、4-ジメチルアミノピリジン等の有機塩基、もしくは炭酸ナトリウム、水酸化ナトリウム、炭酸水素ナトリウム、酢酸ナトリウム、炭酸カリウム、水酸化カリウム等の無機塩基と下記一般式(b1)、(d1)、(h1)、(i1)で示される化合物のいずれかと反応させることで、それぞれ(b)、(d)、(h)、(i)を導入することができる。また、上記有機塩基、無機塩基は用いなくとも良い。有機塩基、無機塩基の使用割合は、特に制限はないが、化合物(p)に対して等モル以上が好ましい。また、有機塩基を溶媒として用いてもよい。(b1)、(d1)におけるWはCl、Br、Iより選択されるハロゲン原子であり、好ましくはClである。一般式(b1)、(d1)、(h1)、(i1)で示される化合物の使用割合は、特に制限はないが、化合物(p)に対して等モル以上が好ましく、更に好ましくは等モル～50モルの範囲で反応させるのが好ましい。反応温度としては、0～300℃が好ましく、更に好ましくは、20～150℃である。反応時間は10分～48時間が好ましく、更に好ましくは30分～24時間である。生成した化合物は、抽出、再結晶、吸着処理、再沈殿、カラムクロマトグラフィー、超臨界抽出等の精製手段にて精製してもよい。



(W は Cl、Br、I より選択されるハロゲン原子)

((a)、(k)の製造方法)

化合物(p)を無水コハク酸や無水グルタル酸等のジカルボン酸無水物と反応させてカルボキシル体(k)を得た後、DCC、EDC等の縮合剤存在下、N-ヒドロキシコハク酸イミドと縮合反応させることで、(a)のコハク酸イミド体を得ることができる。化合物(p)とジカルボン酸無水物との反応は、上述の非プロトン性溶媒、もしくは無溶媒中で行う。ジカルボン酸無水物の使用割合は、特に制限はないが、化合物(p)に対して等モル以上が好ましく、更に好ましくは等モル～5モルである。反応温度としては、0～200℃が好ましく、更に好ましくは、20～150℃である。反応時間は10分～48時間が好ましく、更に好ましくは30分～12時間である。反応にはトリエチルアミン、ピリジン、ジメチルアミノピリジン等の有機塩基や炭酸ナトリウム、水酸化ナトリウム、炭酸水素ナトリウム、酢酸ナトリウム、炭酸カリウム、水酸化カリウム等の無機塩基を触媒として用いてもよい。触媒の使用割合は0.1～50重量%が好ましく、さらに好ましくは0.5～20重量%である。このようにして生成したカルボキシル体(k)は、前述の精製手段にて精製してもよいし、そのまま次の縮合反応に用いても良い。

続く縮合反応も同様に上記非プロトン性溶媒中、もしくは無溶媒中で行う。縮合剤としては、特に制限は無いが、好ましくはDCCである。DCCの使用割合は化合物(p)に対して等モル以上が好ましく、更に好ましくは等モル～5モルである。N-ヒドロキシコハク酸イミドの使用割合は化合物(p)に対して等モル以上が好ましく、更に好ましくは等モル～5モルである。反応温度としては、0～100℃が好ましく、更に好ましくは、20～80℃である。反応時間は10分～48時間が好ましく、更に好ましくは30分～12時間である。生成した化合物は前述の精製手段にて精製してもよい。

((g)、(j)の製造方法)

化合物(p)を水、アセトニトリル等の溶媒中、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム等の無機塩基を触媒とし、アクリロニトリル等を付加させてニトリル体を得たあと、オートクレーブ中で

ニッケルやパラジウム触媒下でニトリル基の水添反応を行うことで(g)のアミン体を得ることができる。ニトリル体を得る際の無機塩基の使用割合は、特に制限はないが、化合物(p)に対して0.01～50重量%が好ましい。アクリロニトリル等の使用割合は、特に制限はないが、化合物(p)の重量に対して0.5～5倍重量が好ましく、更に好ましくは1～4倍重量の範囲で反応させるのが、より好ましい。また、アクリロニトリルを溶媒として用いても良い。反応温度としては、-50～100℃が好ましく、更に好ましくは-20～60℃である。反応時間は10分～48時間が好ましく、更に好ましくは30分～24時間である。続くニトリル体の水添反応における反応溶媒は、反応に関与しない溶媒であれば特に制限は無いが、好ましくはトルエンである。ニッケル、もしくはパラジウム触媒の使用割合は、特に制限は無いが、ニトリル体に対して0.05～30重量%であり、好ましくは0.5～20重量%である。反応温度は20～200℃が好ましく、更に好ましくは、50～150℃である。反応時間は10分～48時間が好ましく、更に好ましくは30分～24時間である。水素圧は2～10MPaが好ましく、更に好ましくは3～8MPaである。また、2量化を防ぐために反応系中にアンモニアを加えてもよい。アンモニアを加える場合のアンモニア圧は特に制限はないが、0.1～10MPaであり、更に好ましくは0.3～2MPaである。生成した化合物は前述の精製手段にて精製してもよい。

上記アミン体(g)、(j)は、(b)をアンモニア水と反応させることでも得ることができる。反応は、アンモニア水中で行い、アンモニアの濃度は特に制限は無いが、好ましくは10～40%の範囲である。アンモニア水の使用割合は、(b)の重量に対して1～300倍であるのが好ましい。反応温度としては、0～100℃が好ましく、更に好ましくは、20～80℃である。反応時間は10分～72時間が好ましく、更に好ましくは1～36時間である。また、アミン体(g)、(j)は、オートクレーブ中、(b)をアンモニアと反応させても得ることができる。反応溶剤については、特に制限はないが、好ましくはメタノール、エタノールが挙げられる。アンモニア量は(b)に対して10～300重量%が好ましく、更に好ましくは20～200重量%である。反応温度としては、50～200℃が好ましく、80～150℃が更に好まし

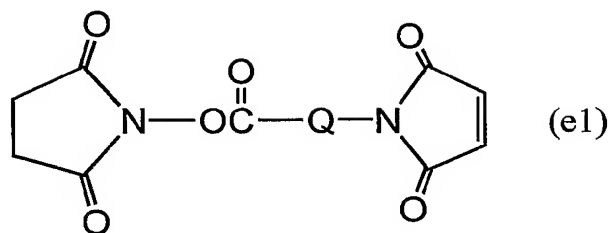
い。反応時間については、10分～24時間が好ましく、更に好ましくは30分～12時間である。生成した化合物は前述の精製手段にて精製してもよい。

((e)の製造方法)

更に、得られた(g)のアミンを、前述の非プロトン性溶媒、もしくは無溶媒中、無水マレイン酸と反応させてマレアミド体を得たあと、無水酢酸及び酢酸ナトリウムを触媒として、閉環反応させることで(e)のマレイミド体を得ることができる。マレアミド化反応における無水マレイン酸の使用割合は、特に制限はないが、化合物(p)に対して等モル以上が好ましく、更に好ましくは等モル～5モルである。反応温度としては、0～200℃が好ましく、更に好ましくは、20～120℃である。反応時間は10分～48時間が好ましく、更に好ましくは30分～12時間である。生成したマレアミド体は、前述の精製手段にて精製してもよいし、そのまま次の閉環反応に用いても良い。

続く閉環反応における反応溶媒は特に限定されないが、非プロトン性溶媒または無水酢酸が好ましい。酢酸ナトリウムの使用割合は、特に制限はないが、マレアミド体に対して等モル以上が好ましく、更に好ましくは等モル～50モルである。反応温度としては、0～200℃が好ましく、更に好ましくは、20～150℃である。反応時間は10分～48時間が好ましく、更に好ましくは30分～12時間である。生成した化合物は前述の精製手段にて精製してもよい。

上記マレイミド体は、下記一般式(e1)と、上述の(g)、(j)のアミンを反応させることでも得ることができる。反応は、前述の非プロトン性溶媒、もしくは無溶媒中で行い、化合物(e1)を(g)、(j)のアミンに対して等モル以上加えて反応させる。(e1)の使用割合は(g)、(j)の等モル以上が好ましく、更に好ましくは等モル～5モルである。反応温度としては、0～200℃が好ましく、更に好ましくは、20～80℃である。反応時間は10分～48時間が好ましく、更に好ましくは30分～12時間である。反応時は遮光してもよい。生成した化合物は前述の精製手段にて精製してもよい。



(Q は炭素数 1 ～ 7 の炭化水素基を示す。)

((f) の製造方法)

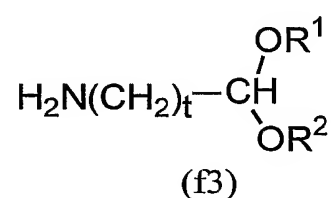
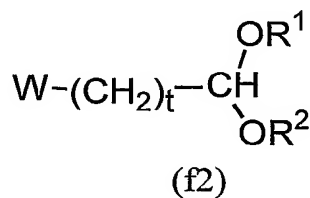
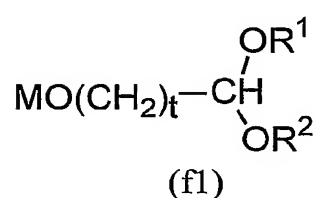
化合物(b)を(f1)のアセタール化合物と反応させてアセタール体を得た後、酸性条件にて加水分解を行うことで、アルデヒド体(f)を得ることができる。化合物(b)の製造は上述の通りである。アセタール化反応は前述の非プロトン性溶媒中、もしくは無溶媒中、(b)と等モル以上、好ましくは等モル～50モルの(f1)を反応させることで得ることができる。(f1)は相当するアルコールから、金属ナトリウム、金属カリウム、水素化ナトリウム、水素化カリウム、ナトリウムメトキシド、カリウム-*t*-ブトキシド等を用いて調製することができる。反応温度としては、0～300℃が好ましく、更に好ましくは、20～150℃である。反応時間は10分～48時間が好ましく、更に好ましくは30分～24時間である。

(f2)を用いる場合は、化合物(p)の水酸基を上述の方法でアルコラートとした後、前述の非プロトン性溶媒中、もしくは無溶媒中、(f2)を等モル以上、好ましくは等モル～100モルの割合で反応を行うことでアセタール体を得ることができる。反応温度としては、0～300℃が好ましく、更に好ましくは、20～150℃である。反応時間は10分～48時間が好ましく、特に好ましくは30分～24時間である。

(f3)を用いる場合は、(a), (b), (d), (h), (i)もしくは(k) と(f3)を反応させることでアセタール体を得ることができる。(a), (b), (d), (h), (i)もしくは(k)の製造については前述の通りである。(f3)との反応では、溶媒は特に制限されないが、好ましくは前述の非プロトン性溶媒中で行う。(a), (b), (d), (h), (i)もしくは(k)に対する(f3)の仕込み割合は、等モル以上が好ましく、更に好ましくは等モル～10モルである。反応温度としては、-30～200℃が好ましく、更に好ましく

は、0～150℃である。反応時間は10分～48時間が好ましく、更に好ましくは30分～24時間である。(k)を用いる場合は、適宜DCC、EDC等の縮合剤を用いても良い。いずれのアセタール化反応も遮光して行っても良い。このようにして得られたアセタール体は前述の精製手段にて精製してもよいし、精製を行わずにそのまま次のアルデヒド化反応に用いても良い。

アルデヒド化は、アセタール体を0.1～50%の水溶液とし、酢酸、リン酸、硫酸、塩酸等の酸にてpH1～4に調整した水溶液中で加水分解させ、製造することができる。反応温度としては、-20～100℃が好ましく、更に好ましくは、0～80℃である。反応時間は10分～24時間が好ましく、更に好ましくは30分～10時間である。反応は遮光して行っても良い。生成した化合物は前述の精製手段にて精製してもよい。



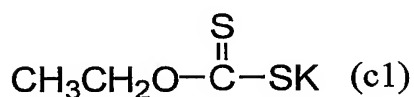
(式中、R¹、R²は炭素数1～3の炭化水素基であり、それぞれ同一であっても、異なっても良い。また相互に環を形成していても良い。Mはナトリウムもしくはカリウムであり、WはCl、Br、Iより選択されるハロゲン原子であり、tは1～5の整数である。)

((c)の製造方法)

(c)のメルカプト体は、化合物(b)とチオウレア等のチア化剤と反応させることで得ることができる。化合物(b)の製造は前述の通りである。チア化反応は水、アルコール、アセトニトリル等の溶媒中もしくは無溶媒中で行う。チオウレアの使用割合は、化合物(b)に対して等モル以上が好ましく、更に好ましくは等モルから50モルの範囲である。反応温度としては、0～300℃が好ましく、更に好ましくは、20～150℃である。反応時間は10分～48時

間が好ましく、更に好ましくは30分～24時間である。反応後、生成したチアゾリウム塩をアルカリ加水分解し、メルカプト体を得ることができる。生成した化合物は前述の精製手段にて精製してもよい。

また、上記メルカプト体は、化合物 (b) を下記化合物(c1)と反応させ、1級アミンにて分解させることでも得ることができる。(b)と(c1)との反応は、前述の非プロトン性溶媒中、もしくは無溶媒中で行う。(c1)の使用割合は、化合物(p)に対して等モル以上が好ましく、更に好ましくは等モルから50モルの範囲である。反応温度としては、0～300℃が好ましく、更に好ましくは、20～80℃である。反応時間は10分～48時間が好ましく、更に好ましくは30分～24時間である。続く1級アミンによるアルカリ分解は、前述の非プロトン性溶媒、もしくは無溶媒中で行う。用いる1級アミンとしては特に制限は無いが、好ましくはアンモニア、メチルアミン、エチルアミン、プロピルアミン、ブチルアミン、ペンチルアミン、ヘキシルアミン、シクロヘキシルアミン、エタノールアミン、プロパノールアミン、ブタノールアミン等が挙げられる。当然、これらの1級アミンを溶媒として用いても良い。生成した化合物は前述の精製手段にて精製してもよい。



本発明によれば、分岐型のポリアルキレングリコールオキシ基によって修飾された生体関連物質を得ることができる。この生体関連物質は、ポリアルキレングリコールオキシ基とのリンカー部分を除き、すべてエーテル結合で形成されるため、1本鎖に分解することなく、高い安定性が期待される。このため、分岐型のポリアルキレングリコールを、生体関連物質に修飾することで、生体内挙動が改善された生体関連物質を提供することができる。本発明の生体関連物質の中間体は、グリセリン骨格の1位の1級炭素に生体関連物質と結合可能な反応性基を有し、2位と3位にポリアルキレングリコール鎖を有する新規化合物である。

＜実施例＞

以下、実施例に基づいて本発明をさらに具体的に説明する。なお、例中の化合物の分析、同定には¹H-NMRおよびGPCを用いた。

＜¹H-NMRの分析方法＞¹H-NMR分析では、日本電子データム（株）製JNM-ECP400を用いた。NMR測定値における積分値は理論値である。

（GPCの分析方法）：GPC分析では、GPCシステムとしてはSHODEX GPC SYSTEM-11を用い、下記条件にて測定を行った。

展開溶媒：テトラヒドロフラン 流速：1 ml/min カラム：SHODEX KF-801, KF-803, KF-804 (I.D. 8mm X 30cm) カラム温度：40℃ 検出器：RI X 8 サンプル量：1mg/g, 100ul

GPC測定値には、高分子量不純物と低分子量不純物を、溶出曲線の変曲点からベースラインに対して垂直に切って除いたメインピークでの解析値、及び溶出開始点から溶出終了点までのピーク全体での解析値を併記した。

M_nは数平均分子量、M_wは重量平均分子量、M_pはピークトップ分子量を表す。

水分量の測定は、カールフィッシャー水分計（メトローム・シバタ製「7S8/3-20型」）を用い、カールフィッシャー試薬は、「ハイドラメール・コンボジット2」（シグマアルドリッチ製）を用いた。

（実施例1）

化合物（p）の合成（R＝メチル基、A¹O、A²O＝オキシエチレン基、n＝0、分子量約10000の場合）

（実施例1-1）

温度計、窒素吹き込み管、攪拌機を付した1000ml丸底フラスコへ2, 2-ジメチルー1, 3-ジオキソラン-4-メタノール132.2g (1.0mol)、ナトリウムメトキシド28%メタノール溶液231.4g (1.2mol)、トルエン500mlを加え、窒素を吹き込みながらトルエンを1時間減圧還流させ、メタノールを留去した。この溶液を80℃保ちながら、ベンジクロリド126.6g (1.0mol)を滴下漏斗を用いて、2時間かけて滴下させ、更に2時間反

応させた。反応液を脱溶媒、蒸留精製(b.p. 93-95°C/266 Pa)し、4-(ベンジルオキシメチル)-2,2-ジメチル-1,3-ジオキソランを得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 内部標準 TMS) δ (ppm): 1.36, 1.42 (3H, 3H, s, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$)

3.45-3.57(2H, m, $\text{CH}_2\text{O}-\text{C}(\text{CH}_3)_2$) 3.73-3.76(1H, m, $\text{CHO}-\text{C}(\text{CH}_3)_2$)

4.03-4.07, 4.28-4.32(2H, m, $\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{Ph}$) 4.57(2H, q, $-\text{CH}_2\text{Ph}$)

7.15-7.40(5H, m, $-\text{CH}_2\text{Ph}$) (Ph はフェニル基を示す)

(実施例 1-2)

1 L ビーカーに、1-1 で精製した 4-(ベンジルオキシメチル)-2,2-ジメチル-1,3-ジオキソラン 222 g (1.0mol)、エタノール 250 ml、蒸留水 400 ml を計りとり、リン酸で pH を 2 に調整した。窒素を吹き込みながら、溶液を 70°C に加温し、1.5 時間反応後、水酸化ナトリウムで pH を 7.0 に調整し、吸着剤「キョーワード 1000」(協和化学工業株式会社製)にて塩を吸着処理し、脱溶剤を行い、3-ベンジルオキシ-1,2-プロパンジオールを得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 内部標準 TMS) δ (ppm): 3.50-3.71(4H, m, CH_2OH , $\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{Ph}$)

3.86-3.91(1H, m, CHOH) 4.54(2H, m, $-\text{CH}_2\text{Ph}$) 7.27-7.38(5H, m, $-\text{CH}_2\text{Ph}$)

(実施例 1-3)

温度計、窒素吹き込み管、攪拌機を付した 300 ml 丸底フラスコへ 3-ベンジルオキシ-1,2-プロパンジオール 27.3 g (0.15mol)、脱水トルエン 127 g、金属ナトリウム 0.9 g (39mmol:26mol%)を加え、窒素を吹き込みながら金属ナトリウムが溶解するまで室温で攪拌した。この溶液を 5 L オートクレープへ仕込み、系内を窒素置換後、100°C に昇温し、100~150°C、1 MPa 以下の圧力でエチレンオキシド 1473 g (33.5mol)を加えた後、更に 1 時間反応を続けた。減圧にて未反応のエチレンオキシドガスを除去後、60°C に冷却して 85%リン酸水溶液にて pH を 7.5 に調整し、下記化合物(p1)を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 内部標準 TMS) δ (ppm): 3.40-3.80(901H, m, $-\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{H}$,

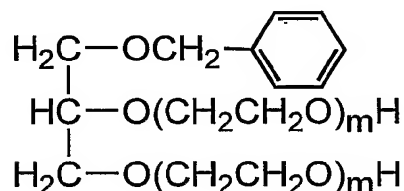
$\text{CHO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{H}$, $\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{Ph}$), 4.54(2H, s, $-\text{CH}_2\text{Ph}$) 7.27-7.38(5H, m, $-\text{CH}_2\text{Ph}$)

G P C 分析 ; 〈メインピーク〉 数平均分子量(Mn) : 9978 重量平均分子量(Mw) :

10171 多分散度(Mw/Mn) : 1.019 ピークトップ分子量 (M_p) : 10044

〈ピーク全体〉 数平均分子量(Mn) : 9865 重量平均分子量(Mw) : 10114

多分散度(Mw/Mn) : 1.025 ピークトップ分子量 (M_p) : 10044



(p1) m=約112

(実施例 1 - 4)

温度計、窒素吹き込み管、攪拌機、Dean-stark 管、及び冷却管を付した 500 ml 丸底フラスコへ上記化合物(p1)を 100 g (10mmol)、トルエン 320 g を仕込み、加熱還流させ、水分を共沸除去した。室温へ冷却後、トリエチルアミン 10.12 g (100mmol)、メタンスルホン酸クロリド 6.87 g (60mmol)を加え、40℃にて6時間反応させた。反応液をろ過後、ろ液を温度計、窒素吹き込み管、攪拌機、及び冷却管を付した 500 ml 丸底フラスコへ移し、ナトリウムメトキシド 28%メタノール溶液 19.3 g (100mmol)を加え、70℃で6時間反応させた。続いて反応液へ吸着剤「キョーワード 700」(協和化学工業株式会社製)を 27 g 加え、更に 70℃で1時間攪拌し、過剰のナトリウムメトキシドを吸着処理させた。反応液をろ過後、濾液を 1 L ビーカーへ仕込み、酢酸エチル 300 g、ヘキサン 350 g を加えて晶析を行った。析出した結晶を 1 L ビーカーへ濾取し、酢酸エチル 400 g を加えて 40℃にて加温溶解後、ヘキサン 300 g を加えて再度晶析を行い、析出した結晶を濾取、乾燥し、下記化合物(p2)を得た。

¹H-NMR (CDCl₃, 内部標準 TMS) δ (ppm) : 3.38(6H, s, -CH₃)

3.40-3.80(901H, m, -CH₂O (CH₂CH₂O)_m CH₃, CHO(CH₂CH₂O)_mCH₃, CH₂OCH₂Ph

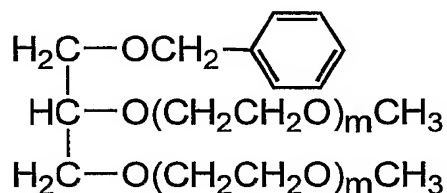
4.54(2H, s, -CH₂Ph) 7.27-7.38(5H, m, -CH₂Ph)

G P C 分析； 〈メインピーク〉 数平均分子量(Mn)：10320 重量平均分子量(Mw)：

10551 多分散度(Mw/Mn)：1.022 ピークトップ分子量 (M_p)：10390

〈ピーク全体〉 数平均分子量(Mn)：10128 重量平均分子量(Mw)：10452

多分散度(Mw/Mn)：1.032 ピークトップ分子量 (M_p)：10390



(p2) m=約112

(実施例 1-5)

温度計、窒素吹き込み管、攪拌機、及び冷却管を付した 500 ml 丸底フラスコへ上記化合物(p2)を 15 g、5%パラジウムカーボン(50%含水品)15 gを仕込み、窒素置換後、メタノール300 ml、シクロヘキセン150 mlを加えて昇温し、52～55℃で緩やかに還流させ、5時間反応させた。反応液を室温まで冷却後、パラジウムカーボンを濾別し、濾液を濃縮した。濃縮液に酢酸エチル50 ml、ヘキサン50 mlを加えて晶析させた。得られた結晶を濾取、乾燥し、下記化合物(p3)を得た。

¹H-NMR (CDCl₃, 内部標準 TMS) δ (ppm)： 3.38(6H, s, -CH₃)

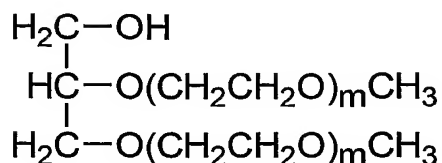
3.40-3.80(901H, m, -CH₂O (CH₂CH₂O)_m CH₃, CHO(CH₂CH₂O)_mCH₃, CH₂OH)

G P C 分析； 〈メインピーク〉 数平均分子量(Mn)：10069 重量平均分子量(Mw)：

10227 多分散度(Mw/Mn)：1.016 ピークトップ分子量 (M_p)：10351

〈ピーク全体〉 数平均分子量(Mn)：9860 重量平均分子量(Mw)：10294

多分散度(Mw/Mn)：1.044 ピークトップ分子量 (M_p)：10351



(p3) m=約112

(実施例2) メシレート体(群I (b)、Y=CH₃)の合成 (R=メチル基、A¹O、A²O=オキシエチレン基、n=0、分子量約10000の場合)

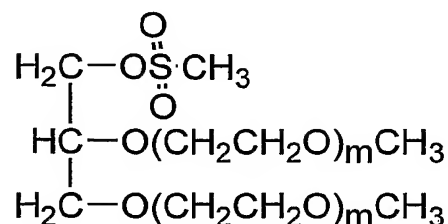
温度計、窒素吹き込み管、攪拌機、Dean-stark 管、及び冷却管を付した200ml丸底フラスコへ上記化合物(p3)を20g(2mmol)、トルエン75gを仕込み、加熱還流させ、水分を共沸除去した。室温へ冷却後、トリエチルアミン1.012g(10mmol)、メタンスルホン酸クロリド0.687g(6mmol)を加え、40℃にて6時間、更に50℃で1時間反応させた。反応液をろ過後、ろ液をへ吸着剤「キョーワード1000」(協和化学工業株式会社製)を1.0g加え、更に60℃で1時間攪拌し、副生成物のメタンスルホン酸のトリエチルアミン塩を吸着処理させた。反応液をろ過後、濾液を500mlビーカーへ仕込み、酢酸エチル100ml、ヘキサン150mlを加えて晶析を行った。析出した結晶を300mlビーカーへ濾取し、酢酸エチル100mlを加えて40℃にて加温溶解後、ヘキサン100mlを加えて再度晶析を行い析出した結晶を濾取、乾燥し、下記メシレート体(p4)を得た。

¹H-NMR (CDCl₃, 内部標準 TMS) δ(ppm): 3.08(3H, s, -SO₃CH₃) 3.38(6H, s, -CH₃) 3.40-3.80(899H, m, -CH₂O(CH₂CH₂O)_mCH₃, CHO(CH₂CH₂O)_mCH₃) 4.27-4.44(2H, m, -CH₂O SO₃CH₃)

GPC分析; (メインピーク) 数平均分子量(Mn): 10054 重量平均分子量(Mw): 10214 多分散度(Mw/Mn): 1.016 ピークトップ分子量(M_p): 10442

(ピーク全体) 数平均分子量(Mn): 9778 重量平均分子量(Mw): 10252

多分散度(Mw/Mn): 1.049 ピークトップ分子量(M_p): 10442

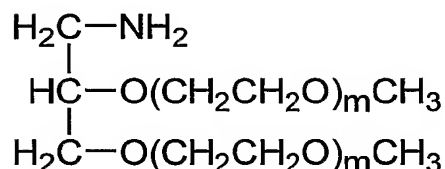


(p4) $m = \text{約}112$

(実施例 3) アミノ体(群 II (j)) の合成 ($R = \text{メチル基}$, A^1O , $A^2O = \text{オキシエチレン基}$, $n = 0$, 分子量約 10000 の場合)

温度計、攪拌機、及び冷却管を付した 100 ml 丸底フラスコへ上記メシレート体(p4)を 1 g (0.1mmol)、28%アンモニア水 50 ml を仕込み、50℃で 36 時間攪拌した。液温を 65℃に上げ、2 時間窒素を吹き込みながら、アンモニアを除去した。室温へ冷却後、食塩 10 g を加え、クロロホルム 10 ml にて抽出を 3 回行った。得られたクロロホルム層を硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過後、クロロホルムを留去した。得られた濃縮液にヘキサンを 100 ml 加えて再沈殿を行い、析出した結晶を濾取、乾燥し、下記アミノ体 (p5) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O , 内部標準 $\text{H}_2\text{O} = 4.7\text{ppm}$) δ (ppm): 3.38(6H, s, $-\text{CH}_3$)
 2.93-3.11(2H, m, $-\text{CH}_2\text{NH}_2$) 3.40-3.80(899H, m, $-\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_3$,
 $\text{CHO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_3$)

(P5) $m = \text{約}112$

(実施例 4) アルデヒド体(群 I (f)) の合成 ($R = \text{メチル基}$, A^1O , $A^2O = \text{オキシエチレン基}$, $n = 0$, 分子量約 10000 の場合)

(実施例 4-1)

温度計、窒素吹き込み管、攪拌機、Dean-stark 管、及び冷却管を付した 200 ml 丸底フラ

スコへ上記メシレート体(p4)を10g(1mmol)、トルエン40mlを仕込み、加熱還流させ、水分を共沸除去し、室温へ冷却した。一方、温度計、窒素吹き込み管、攪拌機、Dean-stark 管、及び冷却管を付した100ml丸底フラスコへ、3,3-ジエトキシ-1-プロパノール14.8g(0.1mol)、トルエン40mlを仕込み、加熱還流させ、水分を共沸除去した。室温へ冷却後、金属ナトリウム0.36g(15.6mmol)を加え、室温で溶解するまで2時間攪拌した。

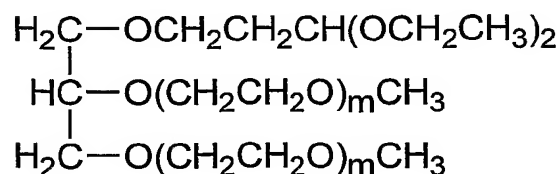
金属ナトリウムの溶解を確認後、反応液を上記脱水を行った化合物(p4)の入った丸底フラスコへ投入し、110℃で12時間反応させた。反応液を40℃まで冷却後、イオン交換水0.36g(20mmol)を加えて30分攪拌後、20%食塩水50mlを加え、85%リン酸を用いて水層のpHを7.0に調整した。上層のトルエン層をとった後、水槽をクロロホルムにて2回抽出し、トルエン層とクロロホルム層をあわせて硫酸ナトリウムで乾燥させ、ろ過後、トルエンとクロロホルムを留去し、濃縮を行った。濃縮液に酢酸エチル50mlを加えて加温溶解後、ヘキサン50mlを加えて結晶を析出させた。得られた結晶を濾取し、酢酸エチル50mlを加えて加温溶解後、ヘキサン50mlを加えて再度結晶を析出させた。この再沈殿操作を3回繰り返したあと、得られた結晶を濾取、乾燥し、下記アセタール体(p6)を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 内部標準 TMS) δ (ppm): 1.20(6H, t, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$)
 1.88-1.92(2H, m, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$) 3.38(6H, s, $-\text{CH}_3$)
 3.40-3.80(907H, m, $-\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_3$, $\text{CHO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$)
 4.64(1H, t, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$)

GPC分析; 〈メインピーク〉 数平均分子量(Mn): 9898 重量平均分子量(Mw): 10076
 多分散度(Mw/Mn): 1.018 ピークトップ分子量(Mp): 10215

〈ピーク全体〉 数平均分子量(Mn): 9297 重量平均分子量(Mw): 9932

多分散度(Mw/Mn): 1.068 ピークトップ分子量(Mp): 10215

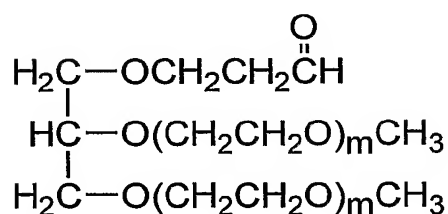


(p6) m=約112

(実施例 4-2)

得られたアセタール体(p6)の4 gを200 ml ビーカーへはかりとり、イオン交換水80 gを加えて結晶を溶解後、85%リン酸を用いてpHを1.5へ調整し、室温で2時間攪拌した。その後、食塩16 gを加えて溶解させ、30%水酸化ナトリウム水溶液にてpHを7.0へ調整し、クロロホルム抽出を行った。得れたクロロホルム層を硫酸ナトリウムで乾燥させ、ろ過後、クロロホルムを留去し、濃縮を行った。濃縮液にトルエン30 ml、酢酸エチル30 mlを加えて加温溶解後、ヘキサン60 mlを加えて結晶を析出させ、濾取した。得られた結晶を200 ml ビーカーへ計りとり、トルエン30 ml、酢酸エチル30 mlを加えて加温溶解後、ヘキサン60 mlを加えて結晶を再度析出させ、濾取し、乾燥し、下記アルデヒド体 (p7)を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 内部標準 TMS) δ (ppm): 2.65(2H, m, CH_2COH) 3.38(6H, s, $-\text{CH}_3$) 3.40-3.80(903H, m, $-\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m$, $\text{CHO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m$, $\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{COH}$) 9.78(1H, m, CH_2COH)



(p7) m=約112

(実施例 5)

100 mM リン酸2水素ナトリウム溶液50 ml 中へ、シアノトリヒドロほう酸ナトリウム63 mg (20 mM)を加えて溶解させた。この溶液1 mlへOVA (ALBUMIN, CHIKEN EGG

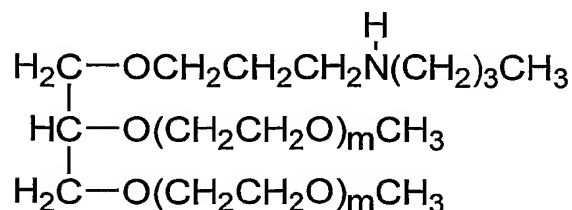
分子量約 4 万) 5. 0 m g (0.1 μ mol)、アルデヒド体(p7) 1 0 0 m g を加え、室温で 1 2 時間攪拌した。反応液をイオン交換水にて 5 倍希釈し、この希釈液 2 0 μ l とトリス SDS サンプル処理液 2 0 μ l を混合後、沸騰水浴中で 2 分 3 0 秒加温した。この処理液をドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (4 - 2 0 %) 分析した。染色は C B B 染色で行った。結果を図 1 に示す。(A) は OVA+アルデヒド体、(B) は OVA のみ、(C) はマーカー (Bio-rad Broad range SDS-PAGE standards) であり、上から分子量 201000, 130000, 94000, 48600, 36400, 29800, 20600, 6600 のバンドを示す。

これらの結果、(A) において、原料 OVA のバンドは残存せず、OVA 1 分子あたり 1 ~ 1 5 個所の化合物(p6)の修飾を受けた場合に相当する分子量のバンドが観察された。

(実施例 6)

本発明の化合物の安定性を評価するため、以下のモデル化合物を合成し、安定性の比較を行った。

(実施例 6 - 1) シアノトリヒドロほう酸ナトリウム 6 3 m g (2 0 m M) をメタノール 5 0 m l へ溶解させた。この溶液 2 m l 中へ、アルデヒド体(p7) 0. 5 g、n-ブチルアミン 5 0 μ l を加えて室温で 1 8 時間攪拌した。メタノールを留去、濃縮を行った後、濃縮液にクロロホルム 2 0 m l、2 0 % 食塩水 2 0 m l を加えて抽出を行い、この抽出操作を 3 回繰り返した。得られたクロロホルム層を硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過後、濃縮した。濃縮液に酢酸エチル 2 0 m l を加えて加温溶解後、ヘキサン 3 0 m l を加えて結晶を析出させ、濾取した。得られた結晶を 1 0 0 m l ビーカーへとり、酢酸エチル 2 0 m l を加えて加温溶解後、ヘキサン 2 0 m l を加えて結晶を再度析出させ、濾取、乾燥し、下記化合物 (p 8) を得た。



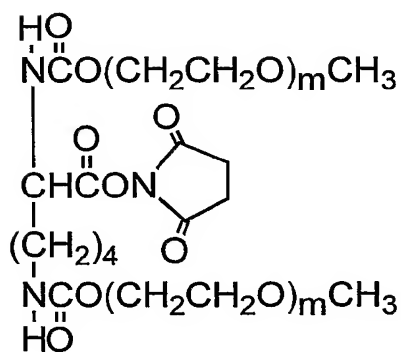
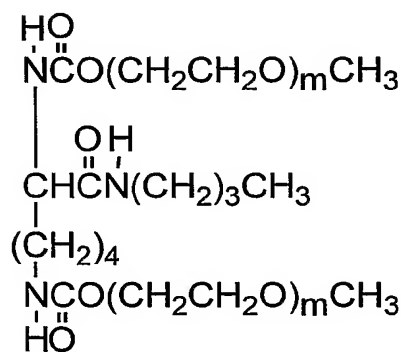
(p8) $m \approx 112$

(実施例 6-2) 安定性評価(加速劣化試験)

合成した上記化合物 (p8) 12 mg を計りとり、100 mM リン酸緩衝液 (pH = 8.8) 1 ml を加えて、75 °C 水浴中にて 12 時間攪拌した。開始前と攪拌終了後、GPC 測定を行った。結果を図 2、3 に示す。図 2 は化合物 (p8) の開始前サンプルの GPC チャート、図 3 は (p8) の加温後サンプルの GPC チャートである。

(比較例 1)

Shearwater Polymers, Inc. より購入した分子量約 10700 の下記化合物(p9)を 107 mg 計りとり、n-ブチルアミン 10 μ l とクロロホルム 1 ml を加えて室温で 18 時間攪拌した。クロロホルムを留去、濃縮し、濃縮液に酢酸エチル 20 ml を加えて加温溶解後、ヘキサン 30 ml を加えて結晶を析出させ、濾取した。得られた結晶を 100 ml ビーカーへとり、酢酸エチル 20 ml を加えて加温溶解後、ヘキサン 20 ml を加えて結晶を再度析出させ、濾取、乾燥し、下記化合物(p10)を得た。

(p9) $m \approx 118$ (p10) $m \approx 118$

合成した上記化合物 (p 1 0) を用い、実施例 6 - 2 と同じ操作を行い、GPC 測定を行った。結果を図 4、5 に示す。図 4 は化合物 (p 1 0) の開始前サンプルの GPC チャート、図 5 は (p 1 0) の加温後サンプルの GPC チャートである。

図 2、3 の結果から、本発明の化合物は加水分解は起きず、高い安定性を示すことが示された。一方、図 4、5 の結果から、比較例の (p 1 0) では 1 / 2 分子量体が約 2 5 % 生成しており、ウレタン結合が分解し、分岐型ポリエチレングリコールが一本鎖に分解していることが示された。

(実施例 7) 化合物 (p) の合成 (R = メチル基、A¹O、A²O = オキシエチレン基、n = 0、分子量約 1 9 0 0 0 の場合)

(実施例 7 - 1)

実施例 1 - 3 と同じ操作にて、エチレンオキシド 2 8 5 0 g (64.8mol) を仕込み、下記化合物 (p11) を得た。

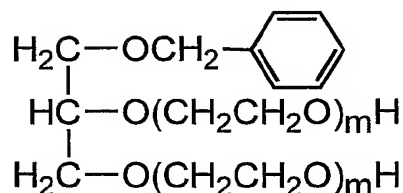
¹H-NMR (CDCl₃, 内部標準 TMS) δ (ppm): 3.40-3.80 (1733H, m, -CH₂O (CH₂CH₂O)_mH, CHO(CH₂CH₂O)_mH, CH₂OCH₂Ph) 4.54 (2H, s, -CH₂Ph)
7.27-7.38 (5H, m, -CH₂Ph)

G P C 分析 ; 〈メインピーク〉 数平均分子量(Mn) : 18521 重量平均分子量(Mw) : 18758

多分散度(Mw/Mn) : 1.013 ピークトップ分子量 (M_p) : 19108

〈ピーク全体〉 数平均分子量(Mn) : 18403 重量平均分子量(Mw) : 18913

多分散度(Mw/Mn) : 1.028 ピークトップ分子量 (M_p) : 19108



(p11) m = 約 216

(実施例 7-2)

実施例 1-4 と同じ操作にて、(p11)を 100 g (5mmol)、トルエン 320 g、トリエチルアミン 5.06 g (50mmol)、メタンスルホン酸クロリド 3.44 g (30mmol)、ナトリウムメトキシド 28%メタノール溶液 9.65 g (50mmol)を用いて、下記化合物(p12)を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 内部標準 TMS) δ (ppm): 3.38(6H, s, $-\text{CH}_3$)

3.40-3.80(1733H, m, $-\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_3$, $\text{CHO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_3$, $\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{Ph}$)

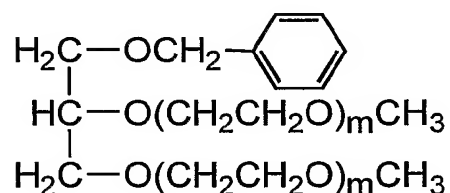
4.54(2H, s, $-\text{CH}_2\text{Ph}$) 7.27-7.38(5H, m, $-\text{CH}_2\text{Ph}$)

GPC 分析; 〈メインピーク〉 数平均分子量(Mn): 18365 重量平均分子量(Mw): 18602

多分散度(Mw/Mn): 1.013 ピークトップ分子量 (M_p): 18992

〈ピーク全体〉 数平均分子量(Mn): 18290 重量平均分子量(Mw): 18861

多分散度(Mw/Mn): 1.031 ピークトップ分子量 (M_p): 18992



(p12) $m \approx 216$

(実施例 7-3)

実施例 1-5 と同じ操作にて、下記化合物(p13)を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 内部標準 TMS) δ (ppm): 3.38(6H, s, $-\text{CH}_3$)

3.40-3.80(1733H, m, $-\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_3$, $\text{CHO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_3$, CH_2OH)

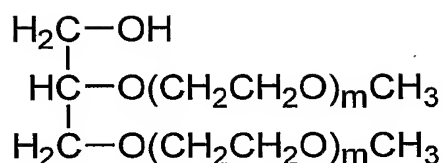
GPC 分析; 〈メインピーク〉 数平均分子量(Mn): 18395 重量平均分子量(Mw): 18632

多分散度(Mw/Mn): 1.013 ピークトップ分子量 (M_p): 18989

〈ピーク全体〉 数平均分子量(Mn): 18146 重量平均分子量(Mw): 18750

多分散度(M_w/M_n) : 1.033

ピークトップ分子量 (M_p) : 18989



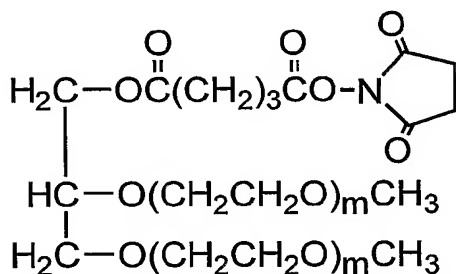
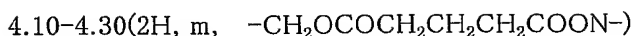
(p13) m=約216

(实施例 8)

カルボキシル体(群 II(k))、及びコハク酸イミドエステル体(群 I (a))の合成 (R=メチル基、A¹O、A²O=オキシエチレン基、n=0、分子量約19000の場合

温度計、窒素吹き込み管、攪拌機、Dean-stark 管、及び冷却管を付した 200 ml 丸底フラスコへ上記化合物(p13)を 20 g (1.0mmol)、酢酸ナトリウム 50 mg、トルエン 100 ml を仕込み、加熱還流させ、水分を共沸除去した。反応液へ無水グルタル酸 137 mg (1.2mmol)を加え、105℃で12時間反応させた。反応終了後、反応液を40℃に冷却し、N-ヒドロキシコハク酸イミド 150 mg (1.3mmol)、ジシクロヘキシルカルボジイミド 289 mg (1.4mmol)を加え、そのまま6時間反応させた。反応液をろ過して析出したウレアを除去し、ろ液へ酢酸エチル 50 ml を加えた後、ヘキサン 150 ml を加えて結晶を析出させた。析出した結晶をろ取り、結晶を酢酸エチル 100 ml を加えて加温溶解後、ヘキサン 100 ml を加えて再度結晶化させた。析出した結晶をろ取、乾燥し、下記コハク酸イミドエステル体(p14)を得た。

¹H-NMR (CDCl₃, 内部標準 TMS) δ (ppm): 2.07(2H, m, -OCOCH₂CH₂CH₂COON-)
2.50(2H, t, -OCOCH₂CH₂CH₂COON-) 2.72(2H, t, -OCOCH₂CH₂CH₂COON-)
2.84(4H, s, succinimide) 3.38(6H, s, -CH₃) 3.40-3.80(1731H, m, -CH₂O (CH₂CH₂O)_m)



(p14) $m \approx 216$

(実施例 9)

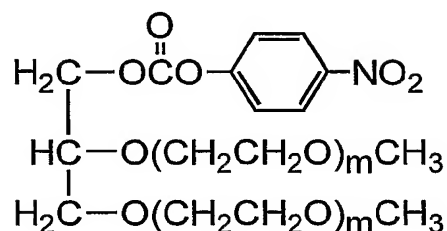
p-ニトロフェニルカーボネート体(群 I (d))の合成 (R=メチル基、A¹O、A²O=オキシエチレン基、n=0、分子量約19000の場合)

温度計、窒素吹き込み管、攪拌機、Dean-stark 管、及び冷却管を付した200ml丸底フラスコへ上記化合物(p13)を20g (1.0mmol)、トルエン100mlを仕込み、加熱還流させ、水分を共沸除去した。反応液を80℃に降温し、トリエチルアミン、p-ニトロフェニルクロロホルメートを加え、80℃で5時間反応させた。反応終了後、反応液をろ過し、ろ液へ酢酸エチル100mlを加えた後、ヘキサン200mlを加えて結晶を析出させた。析出した結晶をろ取し、結晶を酢酸エチル100mlを加えて加温溶解後、ヘキサン100mlを加えて再度結晶化させた。この晶析操作を合計5回繰り返した。ろ取した結晶を乾燥し、下記p-ニトロフェニルカーボネート体(p15)を得た。

¹H-NMR (CDCl₃, 内部標準 TMS) δ (ppm): 3.38(6H, s, $-\text{CH}_3$)

3.40-3.80(1731H, m, $-\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_3$, $\text{CHO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_3$)

4.30-4.50(2H, m, $-\text{CH}_2\text{OCOOPhNO}_2$) 7.39(2H, d, $-\text{PhNO}_2$)

8.28 (2H, d, -Ph NO₂)

(p15) m=約216

(実施例 10)

化合物 (p) の合成 (R=メチル基、A¹O、A²O=オキシエチレン基、n=約 15、分子量約 19500 の場合)

温度計、窒素吹き込み管、攪拌機、Dean-stark 管、及び冷却管を付した 500 ml 丸底フラスコへ実施例 7-3 で得られた化合物(p13)を 67 g (3.5mmol)、トルエン 400 ml を仕込み、加熱還流させ、水分を共沸除去した。反応液を 40℃に降温し、ナトリウムメトキシド 28%メタノール溶液 0.41 g (2.1mmol)を加え、70℃に昇温し、窒素バブリングを行いながらトルエン-メタノール混合液約 200 ml を留去した。この溶液を 5L オートクレーブへ仕込み、系内を窒素置換後、100℃に昇温し、100~150℃、1MPa 以下の圧力でエチレンオキシド 9.2 g (0.2mol)を加えた後、更に 3 時間反応を続けた。減圧にて未反応のエチレンオキシドガス、及びトルエンを除去後、60℃に冷却して 85%リン酸水溶液にて pH を 7.5 に調整し、下記化合物(p16)を得た。

¹H-NMR (CDCl₃, 内部標準 TMS) δ (ppm): 3.38(6H, s, -CH₃)

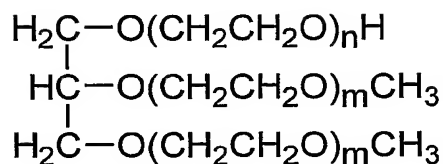
3.40-3.80(1853H, m, -CH₂O (CH₂CH₂O)_m CH₃, -CHO(CH₂CH₂O)_mCH₃ -CH₂O (CH₂CH₂O)_nH)

GPC 分析; (メインピーク) 数平均分子量(Mn): 19153 重量平均分子量(Mw): 19462

多分散度(Mw/Mn): 1.016 ピークトップ分子量 (Mp): 19612

(ピーク全体) 数平均分子量(Mn): 18473 重量平均分子量(Mw): 19087

多分散度(Mw/Mn) : 1.033 ピークトップ分子量 (M_p) : 19612



(p16) m=約216 n=約15

(実施例 11)

メシレート体(群 I (b)、Y=CH₃)の合成 (R=メチル基、A¹O、A²O=オキシエチレン基、
n=約15、分子量約19500の場合)

温度計、窒素吹き込み管、攪拌機、Dean-stark 管、及び冷却管を付した200ml 丸底フラスコへ上記化合物(p16)を10g (0.5mmol)、トルエン75g を仕込み、加熱還流させ、水分を共沸除去した。室温へ冷却後、トリエチルアミン0.253g (2.5mmol)、メタンスルホン酸クロリド0.172g (1.5mmol)を加え、40℃にて6時間、更に50℃で1時間反応させた。反応液をろ過後、ろ液へ吸着剤「キョーワード1000」を0.5g加え、60℃で1時間攪拌し、副生成物のメタンスルホン酸のトリエチルアミン塩を吸着処理させた。反応液をろ過後、濾液を300ml ビーカーへ仕込み、酢酸エチル50ml、ヘキサン70mlを加えて晶析を行った。析出した結晶を300ml ビーカーへ濾取し、酢酸エチル50mlを加えて40℃にて加温溶解後、ヘキサン50mlを加えて再度晶析を行い、析出した結晶を濾取、乾燥し、下記メシレート体 (p17) を得た。

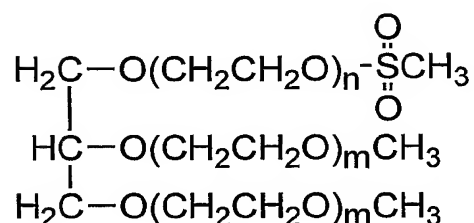
¹H-NMR (CDCl₃, 内部標準 TMS) δ (ppm): 3.08(3H, s, -SO₃CH₃) 3.38(6H, s, -CH₃)
3.40-3.80(1851H, m, -CH₂O (CH₂CH₂O)_m CH₃, -CH₂O (CH₂CH₂O)_nSOOCH₃) 4.37-4.39(2H, m, -CH₂O(CH₂CH₂O)_{n-1}CH₂CH₂O SOOCH₃)

GPC分析; 〈メインピーク〉 数平均分子量(Mn) : 19253 重量平均分子量(Mw) : 19601

多分散度(Mw/Mn) : 1.018 ピークトップ分子量 (M_p) : 19770

〈ピーク全体〉 数平均分子量(Mn) : 18400 重量平均分子量(Mw) : 19140

多分散度(Mw/Mn) : 1.040 ピークトップ分子量 (Mp) : 19770



(p17) m=約216 n=約15

(実施例12)

アルデヒド体(群I (f))の合成 (R=メチル基、A¹O、A²O=オキシエチレン基、n=約15、分子量約19500の場合)

(実施例12-1)

温度計、窒素吹き込み管、攪拌機、Dean-stark 管、及び冷却管を付した200ml 丸底フラスコへ上記メシレート体(p17)を10g (0.5mmol)、トルエン40ml を仕込み、加熱還流させ、水分を共沸除去し、室温へ冷却した。一方、温度計、窒素吹き込み管、攪拌機、Dean-stark 管、及び冷却管を付した100ml 丸底フラスコへ、3,3-ジエトキシー1-プロパノール7.4g (50mmol)、トルエン40ml を仕込み、加熱還流させ、水分を共沸除去した。室温へ冷却後、金属ナトリウム0.17g (7.4mmol)を加え、室温で溶解するまで2時間攪拌した。金属ナトリウムの溶解を確認後、反応液を上記脱水を行った化合物(p17)の入った丸底フラスコへ投入し、70℃で4時間反応させた。反応液を40℃まで冷却後、イオン交換水0.18g (10mmol)を加えて30分攪拌後、20%食塩水30ml を加え、85%リン酸を用いて水層のpHを7.0に調整した。上層のトルエン層をとった後、水槽をクロロホルムにて2回抽出し、トルエン層とクロロホルム層をあわせて硫酸ナトリウムで乾燥させ、ろ過後、トルエンとクロロホルムを留去し、濃縮を行った。濃縮液に酢酸エチル50ml を加えて加温溶解後、ヘキサン50ml

1を加えて結晶を析出させた。得られた結晶を濾取し、酢酸エチル50mlを加えて加温溶解後、ヘキサン50mlを加えて再度結晶を析出させた。この再沈殿操作を3回繰り返したあと、得られた結晶を濾取、乾燥し、下記アセタール体(p18)を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 内部標準 TMS) δ (ppm): 1.20(6H, t, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$)

1.88-1.92(2H, m, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$) 3.38(6H, s, $-\text{CH}_3$)

3.40-3.80(1857H, m, $-\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_3$, $\text{CHO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_3$ $-\text{CH}_2\text{O}$

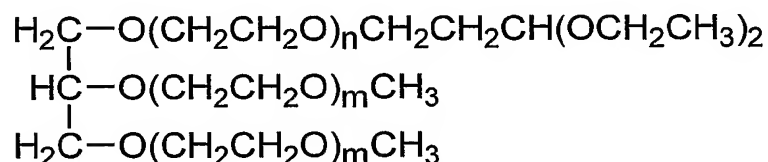
$(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$) 4.64(1H, t, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$)

GPC分析; 〈メインピーク〉 数平均分子量(Mn): 19318 重量平均分子量(Mw): 19699

多分散度(Mw/Mn): 1.020 ピークトップ分子量(Mp): 19770

〈ピーク全体〉 数平均分子量(Mn): 18302 重量平均分子量(Mw): 19168

多分散度(Mw/Mn): 1.047 ピークトップ分子量(Mp): 19770



(p18) $m \approx 216$ $n \approx 15$

(実施例12-2)

得られたアセタール体(p18)の2gを100mlビーカーへはかりとり、イオン交換水40gを加えて結晶を溶解後、85%リン酸を用いてpHを1.5へ調整し、室温で2時間攪拌した。その後、食塩8gを加えて溶解させ、30%水酸化ナトリウム水溶液にてpHを7.0へ調整し、クロロホルム抽出を3回行った。得られたクロロホルム層を硫酸ナトリウムで乾燥させ、ろ過後、クロロホルムを留去し、濃縮を行った。濃縮液にトルエン30ml、酢酸エチル30mlを加えて加温溶解後、ヘキサン60mlを加えて結晶を析出させ、濾取した。得られた結晶を200mlビーカーへ計りとり、トルエン30ml、酢酸エチル30mlを加えて加温溶

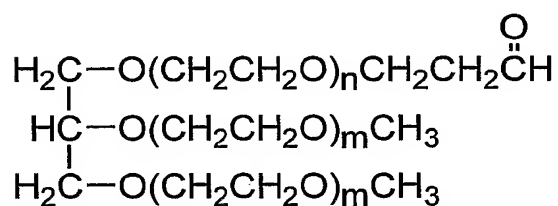
解後、ヘキサン 60 ml を加えて結晶を再度析出させ、濾取、乾燥し、下記アルデヒド体 (p 19) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 内部標準 TMS) δ (ppm): 2.66–2.69(2H, m, CH_2COH)

3.38(6H, s, $-\text{CH}_3$) 3.40–3.80(1855H, m, $-\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_3$

, $\text{CHO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_3$ $-\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COH}$)

9.79(1H, t, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COH}$)



(p19) $m \approx 216$ $n \approx 15$

(実施例 13)

メシレート体(群 I (b)、 $\text{Y}=\text{CH}_3$)の合成 ($\text{R}=\text{メチル基}$ 、 A^1O 、 $\text{A}^2\text{O}=\text{オキシエチレン基}$ 、 $n=0$ 、分子量約 19000 の場合)

化合物 (p 13) を原料とし、実施例 2 と同様の方法にて、下記メシレート体 (p 20) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 内部標準 TMS) δ (ppm): 3.08(3H, s, $-\text{SO}_3\text{CH}_3$)

3.38(6H, s, $-\text{CH}_3$) 3.40–3.80(1731H, m, $-\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_3$,

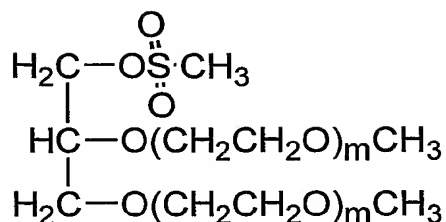
$\text{CHO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_3$) 4.27–4.44(2H, m, $-\text{CH}_2\text{O}\text{SO}_3\text{CH}_3$)

GPC 分析; (メインピーク) 数平均分子量(M_n): 18435 重量平均分子量(M_w): 18682

多分散度(M_w/M_n): 1.013 ピークトップ分子量 (M_p): 18740

(ピーク全体) 数平均分子量(M_n): 18081 重量平均分子量(M_w): 18721 多分散度

(M_w/M_n): 1.035 ピークトップ分子量 (M_p): 18740



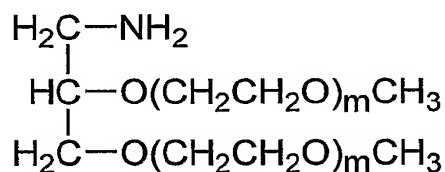
(p20) m=約216

(実施例 14)

アミノ体(群 II (j)) の合成 (R = メチル基、A¹O、A²O = オキシエチレン基、n = 0、分子量約 19000 の場合)

化合物 (p 20) を原料とし、実施例 3 と同様の方法にて下記アミノ体 (p 21) を合成した。

¹H-NMR (D₂O, 内部標準 H₂O=4.7ppm) δ (ppm): 3.38(6H, s, -CH₃)
 2.93-3.11(2H, m, -CH₂NH₂) 3.40-3.80(1731H, m, -CH₂O (CH₂CH₂O)_mCH₃,
 CHO(CH₂CH₂O)_mCH₃)



(P21) m=約216

(実施例 15)

マレイミド体(群 I (e)) の合成 (R = メチル基、A¹O、A²O = オキシエチレン基、n = 0、分子量約 19000 の場合)

温度計、窒素吹き込み管、攪拌機、及び冷却管を付した 100 ml 丸底フラスコへ上記化合物(p 21)を 7.5 g (0.35mmol)、酢酸エチル 35 ml、トリエチルアミン 73 μl を仕込み、

45℃にて加温溶解させた。この溶液へ N-Succinimidyl 3-maleimidopropionate 0.14 g (0.525mmol)を加え、45℃で4時間反応させた。反応終了後、吸着剤「キョーワード700」を0.5 g、「キョーワード1000」0.5 gを加え、45℃で更に1時間攪拌した。反応液をろ過し、濾液にヘキサン50 mlを加えて結晶を析出させ、濾取した。得られた結晶を200 ml ビーカーへ計りとり、酢酸エチル50 mlを加えて加温溶解後、ヘキサン50 mlを加えて結晶を再度析出させ、濾取、乾燥し、下記マレイミド体 (p22) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 内部標準 TMS) δ (ppm): 2.51(2H, t, $\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2$)

3.38(6H, s, $-\text{CH}_3$) 3.40-3.80(1735H, m, $-\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_3$,

$\text{CHO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_3$ $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2$) 6.69(2H, s, $\text{CH}=\text{CH}$)

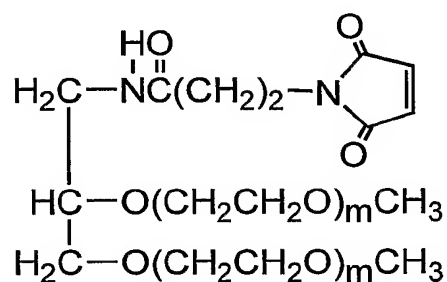
6.86(1H, t, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2$)

GPC分析; 〈メインピーク〉 数平均分子量(Mn): 18425 重量平均分子量(Mw): 18672

多分散度(Mw/Mn): 1.013 ピークトップ分子量 (Mp): 18742

(ピーク全体) 数平均分子量(Mn): 17924 重量平均分子量(Mw): 19086

多分散度(Mw/Mn): 1.065 ピークトップ分子量 (Mp): 18742



(p22) $m \approx 216$

(実施例16) 化合物 (p) の合成 (R = メチル基、 A^1O 、 A^2O = オキシエチレン基、 $n = 0$ 、分子量約20000、約45000の合成)

(実施例16-1)

温度計、窒素吹き込み管、攪拌機を付した 1000 ml 丸底フラスコへ 2, 2-ジメチルー 1, 3-ジオキソラン-4-メタノール 13.2 g (1.0mol)、ナトリウムメトキシド 28% メタノール溶液を 202.5 g (1.05mol)、トルエン 500 ml を加え、窒素を吹き込みながらトルエンを 1 時間減圧還流させ、メタノールを留去した。この溶液を 80℃ 保ちながら、ベンジルクロリド 126.6 g (1.0mol) を滴下漏斗を用いて、2 時間かけて滴下させ、更に 2 時間反応させた。反応後、温度を 60℃ とし、キョーワード 600 を 10 g を加えて 1 時間攪拌した。反応液をろ過後、脱溶媒、蒸留精製 (b.p. 93-95℃/266 Pa) し、4-(ベンジルオキシメチル)-2, 2-ジメチルー 1, 3-ジオキソランを得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 内部標準 TMS) δ (ppm): 1.36, 1.42 (3H, 3H, s, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$)
 3.45-3.57 (2H, m, $\text{CH}_2\text{O}-\text{C}(\text{CH}_3)_2$) 3.73-3.76 (1H, m, $\text{CHO}-\text{C}(\text{CH}_3)_2$)
 4.03-4.07, 4.28-4.32 (2H, m, $\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{Ph}$) 4.57 (2H, q, $-\text{CH}_2\text{Ph}$)
 7.15-7.40 (5H, m, $-\text{CH}_2\text{Ph}$) (Ph はフェニル基を示す)

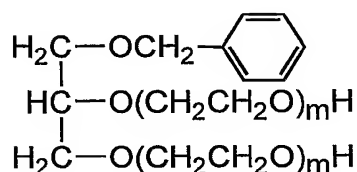
(実施例 16-2)

4-(ベンジルオキシメチル)-2, 2-ジメチルー 1, 3-ジオキソラン 22.2 g (1.0mol)、蒸留水 400 g を加えて、リン酸で pH を 2 に調整し、窒素を吹き込みながら、溶液を 70℃ に加温し、2 時間反応後、水酸化ナトリウムで pH を 7.0 に調整した。クロロホルム 1 L を仕込んで抽出後、クロロホルム層を硫酸マグネシウムで乾燥、濃縮を行った後、濃縮液をろ過して塩を取り除き、3-ベンジルオキシ-1, 2-プロパンジオールを得た。この NMR データは実施例 1-2 と同じである。

(実施例 16-3)

温度計、窒素吹き込み管、攪拌機、減圧ラインを付した 300 ml 丸底フラスコへ 3-ベンジルオキシ-1, 2-プロパンジオール 27.3 g (0.15mol)、脱水トルエン 200 g、金属ナトリウム 0.77 g (33.4mmol: 22.3mol%) を加え、窒素を吹き込みながら温度を 35℃ まで上げ、金属ナトリウムを溶解した。この溶液を事前に十分乾燥した 5 L オートクレーブへ仕込み、系内を窒素置換後、100℃ に昇温し、100~150℃、1 MPa 以下の圧力でエチレンオキ

シド 3090 g を圧入した後、更に 1.5 時間反応を続けた。減圧にて未反応のエチレンオキシドガス、トルエンを留去後、70℃に冷却し、釜内から 2.0 kg を抜き取り、抜いた反応液を 85%リン酸水溶液にて pH を 7.5 に調整し、下記化合物 (p 23) を得た。



(p 23) m = 約 221

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 内部標準 TMS) δ (ppm): 3.40-3.80(1773H, m, $-\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{H}$, $\text{CHO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{H}$, $\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{Ph}$ 4.54(2H, s, $-\text{CH}_2\text{Ph}$) 7.27-7.38(5H, m, $-\text{CH}_2\text{Ph}$)

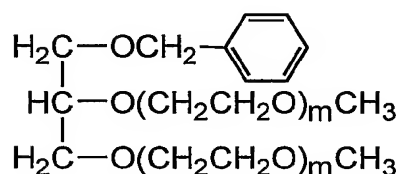
GPC 分析; 〈メインピーク〉 数平均分子量(Mn): 18920 重量平均分子量(Mw): 19154 多分散度(Mw/Mn): 1.012 ピークトップ分子量 (Mp): 19639

〈ピーク全体〉 数平均分子量(Mn): 18777 重量平均分子量(Mw): 19086 多分散度(Mw/Mn): 1.017 ピークトップ分子量 (Mp): 19639

(実施例 16-4)

温度計、窒素吹き込み管、攪拌機、Dean-stark 管、及び冷却管を付した 2 L 丸底フラスコへ上記化合物(p 23)を 200 g (10mmol)、トルエン 1000 g を仕込み、加熱還流させ、トルエン 200 g と水分を共沸除去した。室温へ冷却後、トリエチルアミン 10.12 g (100mmol) を加えて 40℃に加温、メタンスルホニルクロリド 6.87 g (60mmol) を滴下し、40℃にて 3 時間反応させた。反応終了後、ナトリウムメトキシド 28%メタノール溶液 19.28 g (100mmol) を反応液に加え、40℃で 3 時間反応させた。反応液を 40℃に保ちながら減圧し、メタノール/トルエン混合液を約 200 g 留去した後、ろ過にて塩を除去した。ろ液をにトルエン 500 g を加え、温度計、窒素吹き込み管、攪拌機、Dean-stark 管、及び冷却管を付した 2 L 丸底フラスコへ移し、加熱還流させ、トルエン 200 g と水分を共沸除去した。室温へ冷

却後、トリエチルアミン 10.12 g (100mmol)を加えて 40℃に加温、メタンスルホニルクロリド 8.89 g (60mmol)を再度滴下し、40℃にて3時間反応させた。反応終了後、ナトリウムメトキシド 28%メタノール溶液 19.28 g (100mmol)を反応液に加え、40℃で3時間反応させた。反応液を40℃に保ちながら減圧し、メタノール/トルエン混合液を約200g除去した後、ろ過にて塩を除去した。ろ液を50℃に加温し、25%食塩水を200g加え、攪拌後、静置分層し、下層の水層を除去した。この水洗操作は2回繰り返した。上層のトルエン層を硫酸マグネシウムで乾燥後、ろ過し、ろ液に酢酸エチル 1L加え、ヘキサンを結晶が析出するまで加えた。結晶をろ取、乾燥し、下記化合物 (p 24)を得た。



(p 24) $m = 221$

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 内部標準 TMS) δ (ppm): 3.38(6H, s, $-\text{CH}_3$)

3.40–3.80(1773H, m, $-\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_3$, $\text{CHO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_3$, $\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{Ph}$)

4.54(2H, s, $-\text{CH}_2\text{Ph}$) 7.27–7.38(5H, m, $-\text{CH}_2\text{Ph}$)

GPC分析; 〈メインピーク〉 数平均分子量(M_n): 19070 重量平均分子量

(M_w): 19306 多分散度(M_w/M_n): 1.012 ピークトップ分子量 (M_p):

19786

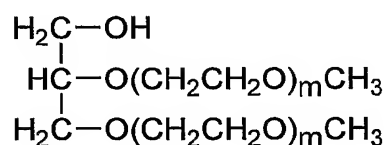
〈ピーク全体〉 数平均分子量(M_n): 18911 重量平均分子量(M_w): 19256

多分散度(M_w/M_n): 1.018 ピークトップ分子量 (M_p): 19786

(実施例 16–5)

加圧ろ過器に5%パラジウムカーボン(50%含水晶、エヌ・イー・エムキャット社製) 120gを仕込み、窒素置換しながら脱水メタノール 500mlで4回溶剤置換を行い、パラジ

ウムカーボンの脱水を行った。温度計、窒素吹き込み管、攪拌機、及び冷却管を付した 2 L 丸底フラスコへ上記化合物(p 2 4)を 1 0 0 g と溶剤置換を行ったパラジウムカーボン全量を仕込み、窒素置換後、脱水メタノール 1 2 0 0 m l、シクロヘキセン 5 0 0 m l を加えて 3 0 °C まで昇温し、そのまま 3. 5 時間反応させた。反応液をろ過し、ろ液の水分量をカールフィッシャー水分計にて測定したところ、1 2 5 9 p p m であった。ろ液を濃縮し、酢酸エチル 1 L を加え、結晶が析出するまでヘキサンを加えた。得られた結晶を濾取、乾燥し、下記化合物(p 2 5)を得た。



(p 2 5) m = 2 2 1

$^1\text{H}-\text{NMR}$ (CDCl_3 , 内部標準 TMS) δ (ppm): 3.38(6H, s, $-\text{CH}_3$)

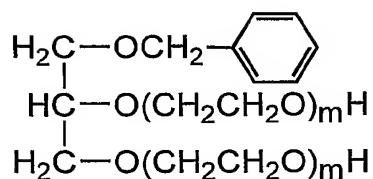
3.40-3.80(1773H, m, $-\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_3$, $\text{CHO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_3$, CH_2OH)

G P C 分析; 〈メインピーク〉 数平均分子量(Mn): 1 8 9 7 1 重量平均分子量(Mw): 1 9 2 0 4 多分散度(Mw/Mn): 1. 0 1 2 ピークトップ分子量(M_p): 1 9 6 8 7

〈ピーク全体〉 数平均分子量(Mn): 1 8 8 1 1 重量平均分子量(Mw): 1 9 1 5 8
多分散度(Mw/Mn): 1. 0 1 8 ピークトップ分子量(M_p): 1 9 6 8 7

(実施例 1 6 - 6)

実施例 1 6 - 3 にて、釜内に残存した反応液約 1 k g に脱水トルエン 2.0 k g を加えた。釜温 95°C、微減圧にて 1. 0 k g のトルエンを留去した後、釜内を窒素置換し、1 2 0 °C に昇温し、1 0 0 ~ 1 5 0 °C、1 M P a 以下の圧力でエチレンオキシド 1 2 6 0 g を圧入し、更に 4 時間反応を続けた。反応終了後、70°C に冷却し、8 5 % リン酸水溶液にて pH を 7. 5 に調整し、下記化合物 (p 2 6) を得た。



(p 26) m=約 505

^1H -NMR (CDCl_3 , 内部標準 TMS) δ (ppm): 3.40-3.80(4045H, m, $-\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{H}$, $\text{CHO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{H}$, $\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{Ph}$) 4.54(2H, s, $-\text{CH}_2\text{Ph}$)
7.27-7.38(5H, m, $-\text{CH}_2\text{Ph}$)

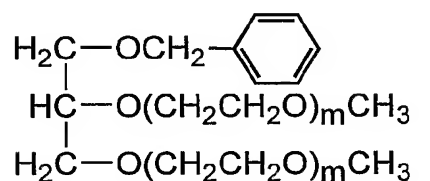
GPC分析; 〈メインピーク〉 数平均分子量(Mn): 41830 重量平均分子量(Mw): 42621 多分散度(Mw/Mn): 1.019 ピークトップ分子量(Mp): 44594

〈ピーク全体〉 数平均分子量(Mn): 40548 重量平均分子量(Mw): 42059 多分散度(Mw/Mn): 1.037 ピークトップ分子量(Mp): 44594

(実施例 16-7)

温度計、窒素吹き込み管、攪拌機、Dean-stark 管、及び冷却管を付した 2 L 丸底フラスコへ式 (p 26) の化合物 270 g (6mmol)、トルエン 1000 g を仕込み、加熱還流させ、トルエン 200 g と水分を共沸除去した。室温へ冷却後、トリエチルアミン 6.65 g (65.7mmol) を加えて 40℃に加温、メタンスルホンクロリド 4.51 g (39.4mmol) を滴下し、40℃にて 3 時間反応させた。反応終了後、ナトリウムメトキシド 28%メタノール溶液 25.3 g (131.4mmol) を反応液に加え、40℃で 3 時間反応させた。反応液を 40℃に保ちながら減圧し、メタノール/トルエン混合液を約 200 g 留去した後、ろ過にて塩を除去した。ろ液にトルエン 500 g を加え、温度計、窒素吹き込み管、攪拌機、Dean-stark 管、及び冷却管を付した 2 L 丸底フラスコへ移し、加熱還流させ、トルエン 200 g と水分を共沸除去した。室温へ冷却後、トリエチルアミン 6.65 g (65.7mmol) を加えて 40℃に加温、メタンスルホンクロリド

4. 51 g (39.4mmol)を再度滴下し、40℃にて3時間反応させた。反応終了後、ナトリウムメトキシド28%メタノール溶液25.3 g (131.4mmol)を反応液に加え、40℃で3時間反応させた。反応液を40℃に保ちながら減圧し、メタノール／トルエン混合液を約200 g 留去した後、ろ過にて塩を除去した。ろ液を50℃に加温し、25%食塩水を200 g 加え、攪拌後、静置分層し、下層の水層を除去した。この水洗操作は2回繰り返した。上層のトルエン層を硫酸マグネシウムで乾燥後、ろ過し、ろ液に酢酸エチル1 L 加え、ヘキサンを結晶が析出するまで加えた。結晶をろ取、乾燥し、下記化合物 (p 27) を得た。



(p 27) m=約505

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 内部標準 TMS) δ (ppm): 3.38(6H, s, $-\text{CH}_3$)

3.40-3.80 (4045H, m, $-\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_3$, $\text{CHO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_3$, $\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{Ph}$)

4.54(2H, s, $-\text{CH}_2\text{Ph}$) 7.27-7.38(5H, m, $-\text{CH}_2\text{Ph}$)

〈メインピーク〉 数平均分子量(Mn): 42206 重量平均分子量(Mw): 43056

多分散度(Mw/Mn): 1.020 ピークトップ分子量 (Mp): 45057

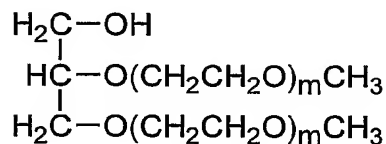
〈ピーク全体〉 数平均分子量(Mn): 40990 重量平均分子量(Mw): 42519

多分散度(Mw/Mn): 1.037 ピークトップ分子量 (Mp): 45057

(実施例16-8)

加圧ろ過器に5%パラジウムカーボン(50%含水品、エヌ・イー・エムキャット社製)200 gを仕込み、窒素置換しながら脱水メタノール500 mlで4回溶剤置換を行い、パラジウムカーボンの脱水を行った。温度計、窒素吹き込み管、攪拌機、及び冷却管を付した2L丸底フラスコへ上記化合物(p 27)100 gと溶剤置換を行ったパラジウムカーボン全量を仕込

み、窒素置換後、脱水メタノール 1200 ml、シクロヘキセン 500 ml を加えて 30℃ で昇温し、そのまま 3.5 時間反応させた。反応液をろ過し、ろ液の水分量をカールフィッシャー水分計にて測定したところ、2215 ppm であった。ろ液を濃縮し、酢酸エチル 1 L を加え、結晶が析出するまでヘキサンを加えた。得られた結晶を濾取、乾燥し、下記化合物(p 28)を得た。



(p 28) $m = 505$

$^1\text{H}-\text{NMR}$ (CDCl_3 , 内部標準 TMS) δ (ppm): 3.38(6H, s, $-\text{CH}_3$)

3.40-3.80 (4045H, m, $-\text{CH}_2\text{O}$ ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_3$, $\text{CHO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_3$, CH_2OH)

〈メインピーク〉 数平均分子量(Mn): 42121 重量平均分子量(Mw): 42946

多分散度(Mw/Mn): 1.020 ピークトップ分子量 (M_p): 45057

〈ピーク全体〉 数平均分子量(Mn): 41021 重量平均分子量(Mw): 42450

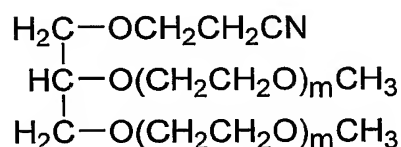
多分散度(Mw/Mn): 1.035 ピークトップ分子量 (M_p): 45057

(実施例 17) アミノ体(群 II (g)) の合成 ($R = \text{メチル基}$, $A^1\text{O}$, $A^2\text{O} = \text{オキシエチレン基}$, $n = 0$, 分子量約 45000 の場合)

(実施例 17-1)

温度計、窒素吹き込み管、攪拌機、及び冷却管を付した 500 ml 丸底フラスコへ上記化合物(p 28)を 70 g とイオン交換水 70 g を加え、40℃ に加温して溶解した。溶解後、10℃ 以下に冷却し、50%水酸化カリウム水溶液 4.38 g を加えた。続いて 5~10℃ を保ちながらアクリロニトリル 210 g を 2 時間かけて滴下した。滴下終了後、更に 2 時間反応させ、8.5%リン酸水溶液 26.25 g を滴下し、中和した。反応液にイオン交換水 140 g を加えて分液

漏斗に移し換え、酢酸エチルを 210 ml 加えて攪拌後、静置し、上層の酢酸エチル層を廃棄した。この酢酸エチル抽出は、6 回繰り返した。抽出終了後、水層に食塩 65 g を加えて溶解し、クロロホルム 280 ml を用いて抽出した。得られたクロロホルム層を硫酸マグネシウムで乾燥し、ろ過後、濃縮した。濃縮液に酢酸エチル 700 ml を加えて溶解し、ヘキサンを結晶が析出するまで加えた。結晶をろ取し、再度酢酸エチル 700 ml に加温溶解し、室温に冷却後、結晶が析出するまでヘキサンを加えた。結晶をろ取、乾燥し、下記ニトリル体 (p 29) を得た。



(p 29) $m = 505$

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 内部標準 TMS) δ (ppm): 2.59-2.66(2H, m, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CN}$)
 3.38(6H, s, $-\text{CH}_3$) 3.40-3.80 (4047H, m, $-\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_3$, $\text{CHO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_3$,
 $\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$

(メインピーク) 数平均分子量(Mn): 41849 重量平均分子量(Mw): 42666

多分散度(Mw/Mn): 1.020 ピークトップ分子量 (Mp): 44594

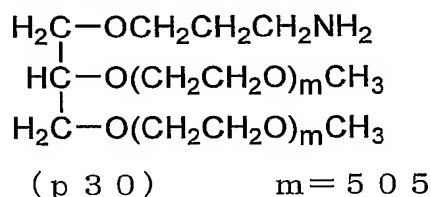
(ピーク全体) 数平均分子量(Mn): 40271 重量平均分子量(Mw): 41980 多

分散度(Mw/Mn): 1.042 ピークトップ分子量 (Mp): 44594

(実施例 17-2)

1L オートクレーブに式 (p 29) のニトリル体 50 g、トルエン 500 g、ニッケル (エヌ・イー・エムキャット社製 5136p) 4.5 g を加え、60℃まで昇温した。アンモニアで内圧 0.7 MPa になるまで加圧し、その後、水素を内圧 4.5 MPa となるまで加圧し、130℃で3時間反応させた。反応後、反応液を 70℃に冷却し、アンモニア臭が消えるまで窒

素ページを繰り返した。反応液を全量抜き取り、ろ過し、ろ液を室温まで冷却後、ヘキサンを結晶が析出するまで加えた。結晶をろ取、乾燥し、下記アミン体 (p 3 0) を得た。

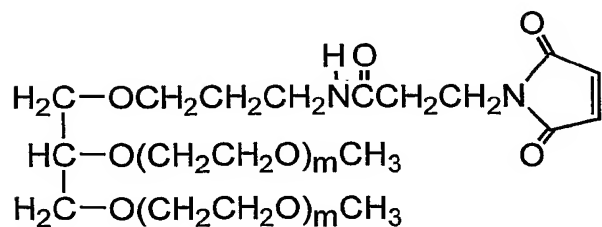


^1H -NMR (CDCl_3 , 内部標準 TMS) δ (ppm): 1.82-1.90(2H, m, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$)
 2.90-2.97(2H, m, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$) 3.38(6H, s, $-\text{CH}_3$)
 3.40-3.80 (4047H, m, $-\text{CH}_2\text{O}$ ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_3$, $\text{CHO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_3$, $\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$)

(実施例 1 8)

マレイミド体(群 I (e))の合成 (R = メチル基、 A^1O 、 A^2O = オキシエチレン基、n = 0、分子量約 4 5 0 0 0 の場合)

温度計、窒素吹き込み管、攪拌機、及び冷却管を付した 3 0 0 m l 丸底フラスコへ式 (p 3 0) の化合物 4 5 g (1mmol)、アセトニトリル 4 2 m l、トルエン 8 4 m l を加え、4 0 °C にて加温溶解した。室温へ冷却後、遮光下、N-メチルモルホリン 0. 5 1 g (5mmol)、N-Succinimidyl 3-maleimidopropionate 3 9 9 m g (1.5mmol) を加えて 3.5 時間反応させた。反応液をろ過後、酢酸エチル 8 4 0 m l を加え、ヘキサンを結晶が析出するまで加えた。結晶をろ取し、アセトニトリル 4 2 m l、酢酸エチル 8 4 0 m l を加えて加温溶解後、ヘキサンを結晶が析出するまで加えた。結晶をろ取、乾燥し、下記 (p 3 1) の化合物を得た。



(p 3 1) m = 5 0 5

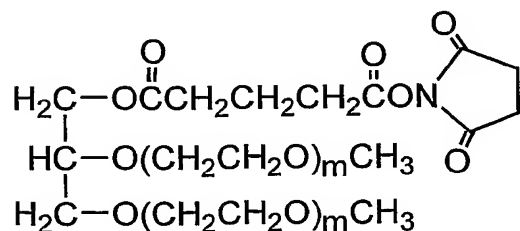
¹H-NMR (CDCl₃, 内部標準 TMS) δ (ppm): 1.70-1.78(2H、m、-CH₂CH₂CH₂N)
2.45-2.53(2H、m、-NHCOCH₂CH₂N) 3.38(6H, s, -CH₃)
3.40-3.80 (4051H, m, -CH₂O(CH₂CH₂O)_mCH₃, CHO(CH₂CH₂O)_mCH₃,
CH₂OCH₂CH₂CH₂NHCOCH₂CH₂)
6.44 (1H、m, NHCO) 6.71(2H, s, -CH=CH-

(メインピーク) 数平均分子量(Mn) : 4 1 9 1 8 重量平均分子量(Mw) : 4 2 7 0 9
 多分散度(Mw/Mn) : 1. 0 1 9 ピークトップ分子量 (Mp) : 4 4 5 9 4
 (ピーク全体) 数平均分子量(Mn) : 4 0 2 3 1 重量平均分子量(Mw) : 4 2 6 0 2
 多分散度(Mw/Mn) : 1. 0 5 9 ピークトップ分子量 (Mp) : 4 4 5 9 4

(实施例 19)

コハク酸イミド体(群 I (a))の合成 (R=メチル基、A¹O、A²O=オキシエチレン基、
n=0、分子量約20000の場合)

温度計、窒素吹き込み管、攪拌機、Dean-Stark管、及び冷却管を付した200ml丸底フラスコへ式(p25)の化合物10g(0.5mmol)、酢酸ナトリウム0.1g、トルエン100mlを加えて還流脱水した。この反応液に無水グルタル酸285mg(2.5mmol)を加え、110℃で12時間反応させた。反応液を冷却後、N-ヒドロキシコハク酸イミド518mg(4.5mmol)、DCC934mg(4.55mmol)を加えて40℃で2時間反応させた。反応液をろ過後、ろ液に結晶が析出するまでヘキサンを加えた。結晶をろ取し、酢酸エチル100ml、アセトニトリル10mlに再度溶解し、溶解液に結晶が析出するまでヘキサンを加えた。結晶をろ取、乾燥し、下記コハク酸イミド体(p32)を得た。



(p 3 2) m = 2 2 1

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 内部標準 TMS) δ (ppm): 2.07(2H, m, $-\text{OCOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COON-}$)
 2.50(2H, t, $-\text{OCOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COON-}$) 2.72(2H, t, $-\text{OCOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COON-}$)
 2.84(4H, s, succinimide) 3.38(6H, s, $-\text{CH}_3$)
 3.40-3.80(1771H, m, $-\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_3$, $\text{CHO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_3$)
 4.10-4.30(2H, m, $-\text{CH}_2\text{OCOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COON-}$)

(実施例 20)

温度計、窒素吹き込み管、攪拌機を付した 300 ml 丸底フラスコへ 3-ベンジルオキシ-1, 2-プロパンジオール 27.3 g (0.15mol)、脱水トルエン 135 g、金属ナトリウム 0.9 g (39mmol : 26mol%)を加え、窒素を吹き込みながら 80°C で金属ナトリウムが溶解するまで攪拌した。溶解後、更に 80°C で 2 時間攪拌し続けた。

この反応液を事前に十分乾燥した 5L オートクレーブへ仕込み、実施例 16-3、実施例 16-6、実施例 16-7、実施例 16-8 と同じ操作を行い、(p 28) と同じ構造の化合物 (p 33) を得た。

(実施例 21)

実施例 1-3 の 3-ベンジルオキシ-1, 2-プロパンジオールのナトリウム化溶液、実施例 16-3 のナトリウム化溶液、実施例 20 のオートクレーブへ仕込む前のナトリウム化溶液を採取し、下記条件にて誘導体化、ガスクロマトグラフィー (GC) 測定を行った。結果を表 3 に示す。

サンプル 0.2 g を計りとり、ピリジン 1.0 ml を加えて溶解後、ヘキサメチルジシラザン 0.8 ml を加えた。この溶液にクロロトリメチルシラン 0.4 ml を加えて 30 分攪拌した。反応液をシリンジフィルター (PTFE, 0.45 μm) でろ過し、下記条件にて GC 測

定を行った。

GCシステム：HP 6890 カラム：HP-5 (0.25 μ m X 30m) 検
 出器：FID 注入口温度：320℃ 注入：スプリットレス 注
 入量：0.2 μ l キャリヤーガス：ヘリウム 流速：23 cm/sec
 カラム温度：80℃ (0min) \rightarrow 15℃/min \rightarrow 320℃ (24min) 検
 出器温度：320℃

<表 3>

	ベンジルアルコール	グリセリン
実施例 1-3	0%	0.4%
実施例 16-3	0%	0.3%
実施例 20	2.2%	1.3%

表 3 の結果、反応性の低分子量不純物の原因となるベンジルアルコール、及び非反応性の高分子量不純物の原因となるグリセリンは、実施例 1-3、16-3 のようなナトリウム化条件で生成しにくいことが判明した。

(実施例 22)

温度計、窒素吹き込み管、攪拌機、Dean-stark 管、及び冷却管を付した 200 ml 丸底フラスコへ、実施例 1-4 で得られた化合物 (p2) 10 g (1mmol)、トルエン 50 g を仕込み、加熱還流させて水分を共沸除去した。室温へ冷却後、トリエチルアミン 2.02 g (20mmol) を加えて 40℃ に加温、メタンスルホンクロリド 0.687 g (6mmol) を滴下し、40℃ にて 3 時間反応させた。反応終了後、塩酸塩をろ過にて除き、ろ液に酢酸エチル 100 ml を加え、ヘキサンを結晶が析出するまで加えた。得られた結晶をろ取し、酢酸エチル 200 ml に加温溶解し、室温へ冷却後、結晶が析出するまでヘキサンを加えた。結晶をろ取し、乾燥した。得られた結晶 20 mg を採取し、重クロロホルムに溶解し、¹H 核磁気共鳴測定を行い (積算 128 回)、スペクトルを得た。このとき、Mme=6、Mms=0.073 であった。

(実施例 23).

実施例 7-2 で得られた化合物 (p 12) を 10 g (0.5mmol)、トリエチルアミン 1.01 g (10mmol)、メタンスルホンクロリド 0.344 g (3mmol) を用い、実施例 22 と同じ操作を行った。核磁気共鳴測定(積算 256 回)を行い、スペクトルを得た。このとき、Mme = 6、Mms = 0.102 であった。

(実施例 24)

実施例 16-4 において、アルキルエーテル化が 2 回終了した化合物 (p 24) 10 g (0.5mmol)、トリエチルアミン 1.01 g (10mmol)、メタンスルホンクロリド 0.344 g (3mmol) を用い、実施例 22 と同じ操作を行った。核磁気共鳴測定(積算 256 回)を行い、スペクトルを得た。このとき、Mme = 6、Mms = 0.019 であった。

(実施例 25)

実施例 16-7 において、アルキルエーテル化が 2 回終了した化合物 (p 27) 11.3 g (0.25mmol) について、トリエチルアミン 0.506 g (5mmol)、メタンスルホンクロリド 0.172 g (1.5mmol) を用い、実施例 22 と同じ操作を行った。核磁気共鳴測定(積算 256 回)を行い、スペクトルを得た。このとき、Mme = 6、Mms = 0.026 であった。

(実施例 26)

実施例 22 ~ 実施例 25 で得られた Mme、Mms、及びピークトップ分子量 (Mp) を用い、Hrd、及び $Hrd/Mp \times 1000000$ を算出した。ピークトップ分子量は、各々、(p 3) (p 13) (p 25) (p 28) のデータを用いた。結果を表 4 に示す。この結果、本発明の式 (p) の化合物のアルキルエーテル化率は高く、アルキルエーテル化反応を繰り返したものについては、更に反応率が高く、水酸基の残存が少ないことが示された。

<表 4>

	Hrd	Mp	Hrd/Mp× 1 0 0 0 0 0 0
実施例 2 2	0 . 0 1 2 0	1 0 3 5 1	1 . 1 6
実施例 2 3	0 . 0 1 6 7	1 8 9 8 9	0 . 8 8
実施例 2 4	0 . 0 0 3 2	1 9 6 8 7	0 . 1 6
実施例 2 5	0 . 0 0 4 3	4 5 0 5 7	0 . 1 0

(実施例 2 7)

温度計、窒素吹き込み管、攪拌機、Dean-stark 管、及び冷却管を付した 2 0 0 m l 丸底フラスコへ、実施例 1 - 5 で得られた化合物 (p 3) 1 0 g (1mmol)、トルエン 5 0 g を仕込み、加熱還流させて水分を共沸除去した。室温へ冷却後、トリエチルアミン 2 . 0 2 g (20mmol) を加えて 40℃ に加温、メタンスルホニルクロリド 0 . 6 8 7 g (6mmol) を滴下し、4 0℃ にて 3 時間反応させた。反応終了後、塩酸塩をろ過にて除き、ろ液に酢酸エチル 1 0 0 m l を加え、ヘキサンを結晶が析出するまで加えた。得られた結晶をろ取し、酢酸エチル 2 0 0 m l に加温溶解し、室温へ冷却後、結晶が析出するまでヘキサンを加えた。結晶をろ取し、乾燥した。得られた結晶 2 0 m g を採取し、重メタノールに溶解し、¹H 核磁気共鳴測定を行い (積算 1 2 8 回)、スペクトルを得た。このとき、3 . 1 3 2 ppm に検出された M 1 を 3 としたとき、3 . 1 1 7 ppm に検出された M 2 は 0 . 2 9 5 であった。

(実施例 2 8)

実施例 1 6 - 5 で得られた化合物 (p 2 5) を 1 0 g (0.5mmol)、トリエチルアミン 1 . 0 1 g (10mmol)、メタンスルホニルクロリド 0 . 3 4 4 g (3mmol) を用い、実施例 2 7 と同じ操作を行った。核磁気共鳴測定 (積算 2 5 6 回) を行い、スペクトルを得た。このとき、M 1 = 3、M 2 = 0 . 0 9 1 であった。

(実施例 2 9)

実施例 1 6 - 8 で得られた化合物 (p 2 8) を 1 1 . 3 g (0.25mmol)、トリエチルアミン 0 .

5.1 g (5mmol)、メタンスルホニルクロリド 0.172 g (1.5mmol)を用い、実施例 27 と同じ操作を行った。核磁気共鳴測定(積算 256 回)を行い、スペクトルを得た。このとき、 $M1 = 3$ 、 $M2 = 0.112$ であった。

(実施例 30)

実施例 20 で得られた化合物 (p 33) 11.3 g (0.25mmol)、トリエチルアミン 0.51 g (5mmol)、メタンスルホニルクロリド 0.172 g (1.5mmol)を用い、実施例 27 と同じ操作を行った。核磁気共鳴測定(積算 256 回)を行い、スペクトルを得た。このとき、 $M1 = 3$ 、 $M2 = 0.212$ であった。

(実施例 31)

実施例 27 ～実施例 30 で得られた $M1$ 、 $M2$ より、 $M2 / (M1 + M2) \times 100$ を算出した。結果を表 5 に示す。この結果、本発明の化合物は高い純度を有することが示された。また、実施例 29 と 30 の結果から、式 (9) の化合物をアルコール化する際、温度を下げてから行う方が、更に高純度となることが判明した。

<表5>

	M1	M2	$M2 / (M1 + M2) \times 100$
実施例 27	3	0.295	8.95
実施例 28	3	0.091	2.94
実施例 29	3	0.112	3.60
実施例 30	3	0.212	6.60
実施例 32	3	0.162	5.12

(実施例 32)

温度計、窒素吹き込み管、攪拌機、及び冷却管を付した 2L 丸底フラスコへ (p 27) の化合物 100 g と 5%パラジウムカーボン (50%含水晶、エヌ・イー・エムキャット社製) 200 g を含水晶のまま仕込み、実施例 16-8 と同じ操作にて脱ベンジル反応を行い、(p 28) と同じ構造の化合物 (p 34) を得た。この際、反応系中の水分量をカールフィッシャー水分計にて測定したところ、4.17%であった。

得られた化合物 (p 3 4) 1 1 . 3 g (0.25mmol)、トリエチルアミン 0 . 5 1 g (5mmol)、メタンスルホニルクロリド 0 . 1 7 2 g (1.5mmol)を用い、実施例 2 7 と同じ操作を行った。核磁気共鳴測定(積算 2 5 6 回)を行い、スペクトルを得た。このとき、 $M_1 = 3$ 、 $M_2 = 0 . 1 6 2$ であった。

表 5 に示すように、実施例 2 9 と実施例 3 2 の結果から、反応系中の水分量を 1 %以下としたほうが、より高純度の式 (p) の化合物を得ることができると判明した。

(実施例 3 3) (ペプチドの修飾)

Humanin(Met-Ala-Pro-Arg-Gly-Phe-Ser-Cys-Leu-Leu-Leu-Leu-Thr-Ser-Glu-Ile-Asp-Leu-Pro-Val-Lys-Arg-Arg-Ala) (分子量 2687.2) のペプチドを 1 0 mMリン酸バッファー (pH=6.4) にて 0 . 5 μ Mに調整した。この溶液 2 0 0 μ l 中に式 (p 3 1) の化合物 4 m g を加え、室温にて 4 時間反応させた。反応液 2 0 0 μ l を、SP-Sephacrose FF (アマシヤム社製) カラムにチャージし、2 0 mM Tris-HCl バッファー (pH=8.2) で平衡化した。平衡化後、バッファーに 1 Nとなる様NaClを加えた溶液をカラムに通し、UVにて溶出液をモニターしながら、(p 3 1) により修飾されたペプチドの分画を得た。この分画 2 0 μ l とトリスSDSサンプル処理液 2 0 μ l を混合後、沸騰水浴中で 2 分 3 0 秒加温し、この溶液 2 0 μ l を、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動 (4-20%) 分析した。染色はCBB染色で行った。結果を図 6 に示す。

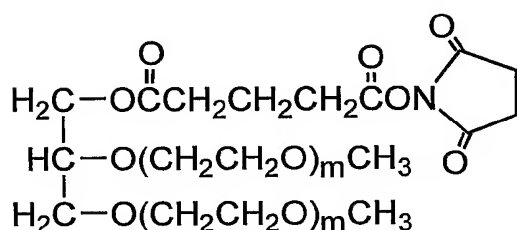
この結果、ペプチドのメルカプト基 (システイン) と (p 3 1) のマレイミドが反応し、修飾されていることが示された。

(実施例 3 4)

コハク酸イミド体(群 I (a))の合成 (R=メチル基、 A^1O 、 A^2O =オキシエチレン基、 $n=0$ 、分子量約 4 5 0 0 0 の場合)

温度計、窒素吹き込み管、攪拌機、Dean-Stark管、及び冷却管を付した 2 0 0 m

1 丸底フラスコへ式 (p 2 8) の化合物 1 1 . 3 g (0.25mmol)、酢酸ナトリウム 0 . 1 g、トルエン 1 0 0 m l を加えて還流脱水した。この反応液に無水グルタル酸 2 8 5 m g (2.5mmol) を加え、110℃で 1 2 時間反応させた。反応液を冷却後、N-ヒドロキシコハク酸イミド 5 1 8 m g (4.5mmol)、DCC 9 3 4 m g (4.55mmol)を加えて 40℃で 2 時間反応させた。反応液をろ過後、ろ液に結晶が析出するまでヘキサンを加えた。結晶をろ取し、酢酸エチル 2 0 0 m l、アセトニトリル 2 0 m l に再度溶解し、溶解液に結晶が析出するまでヘキサンを加えた。結晶をろ取、乾燥し、下記コハク酸イミド体 (p 3 5) を得た。



(p 3 5) m = 5 0 5

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 内部標準TMS) δ (ppm): 2.07(2H, m, $-\text{OCOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COON-}$)
 2.50(2H, t, $-\text{OCOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COON-}$) 2.72(2H, t, $-\text{OCOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COON-}$)
 2.84(4H, s, succinimide) 3.38(6H, s, $-\text{CH}_3$) 3.40-3.80(4043H, m, $-\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m$
 $\text{CH}_3, \text{CHO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_3$)
 4.10-4.30(2H, m, $-\text{CH}_2\text{OCOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COON-}$)

(実施例 3 5) インシュリンの修飾

実施例 1 9 で得られた (p 3 2) のコハク酸イミド体と、実施例 3 4 で得られた (p 3 5) のコハク酸イミド体を用い、インシュリン (SEROLOGICALS CORPORATION製、Recombinant Human Insulin、Mw5800) の修飾を行った。

0 . 1 N炭酸ナトリウムバッファー (pH=9 . 0) を用い、インシュリンの 1 0 m g / m

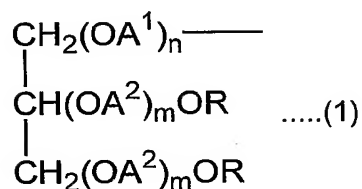
1) バッファー溶液を調製した。この溶液 $100\ \mu\text{l}$ 中に式 (p 3 2) の化合物 $6.8\ \text{mg}$ を加え、 4°C で 20 時間反応させた。反応液全量を、Q-Sepharose FF (アマシヤム社製) カラムにチャージし、 $20\ \text{mM}$ Tris-HCl バッファー ($\text{pH}=8.2$) で平衡化した。平衡化後、バッファーに $1\ \text{N}$ となる様 NaCl を加えた溶液をカラムに通し、UV にて溶出液をモニターしながら、(p 3 2) により修飾されたインシュリンの分画を得た。この分画 $20\ \mu\text{l}$ とトリス SDS サンプル処理液 $20\ \mu\text{l}$ を混合後、沸騰水浴中で 2 分 30 秒加温し、この溶液 $20\ \mu\text{l}$ を、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 ($4-20\%$) 分析した。染色は CBB 染色で行った。

同様に (p 3 5) においても、インシュリンの $10\ \text{mg}/\text{ml}$ バッファー溶液 $100\ \mu\text{l}$ 中に式 (p 3 5) の化合物 $13.6\ \text{mg}$ を加え、同様の処理を行った。

結果を図 7 に示す。この結果、インシュリンが式 (p 3 2)、(p 3 5) に修飾されていることが示された。

請求の範囲

1. 分子中に少なくとも 1 個の下記式 (1) で表されるポリアルキレングリコールオキシ基を結合してなる、修飾された生体関連物質。



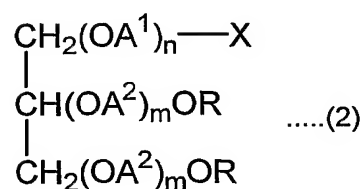
(式中、Rは炭素数 1 ～ 24 の炭化水素基であり、OA¹、OA²は炭素数 2 ～ 4 のオキシアルキレン基であり、R、OA²は一分子中で互いに同一または異なっており、nおよびmは前記オキシアルキレン基の平均付加モル数であり、nは 0 ～ 1000 を示し、mは 10 ～ 1000 を示す。)

2. 式 (1) において、Rがメチル基であり、OA¹、OA²がオキシエチレン基であり、nが 0 ～ 50 であり、mが 20 ～ 800 である、請求項 1 記載の修飾された生体関連物質。

3. 式 (1) において、nが 0 である、請求項 1 または 2 記載の修飾された生体関連物質。

4. 式 (1) において、nが 1 ～ 50 である、請求項 1 または 2 記載の修飾された生体関連物質。

5. 下記式 (2) で示されることを特徴とする、修飾された生体関連物質の中間体。



(式中、Rは炭素数1～24の炭化水素基であり、OA¹、OA²は炭素数2～4のオキシアルキレン基であり、R、OA²は一分子中で互いに同一または異なっており、nおよびmは前記オキシアルキレン基の平均付加モル数であり、nは0～1000を示し、mは10～1000を示し、Xは、修飾前の生体関連物質と化学反応可能な官能基を示す)

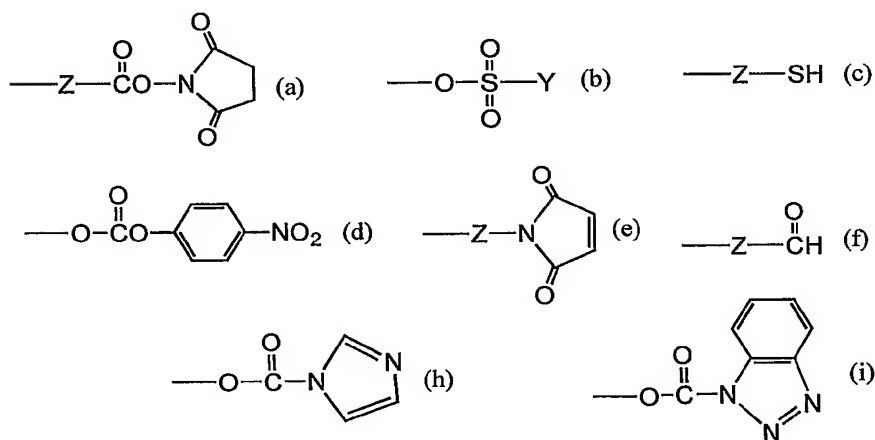
6. 式(2)において、Rがメチル基であり、OA¹、OA²がオキシエチレン基であり、nが0～50であり、mが20～800である、請求項5記載の中間体。

7. 式(2)においてnが0である、請求項5または6記載の中間体。

8. 式(2)においてnが1～50である、請求項5または6記載の中間体。

9. Xが群(I)より選択される基である、請求項5～8のいずれか一つの請求項に記載の中間体。

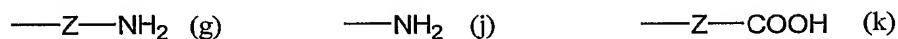
群(I)



(群(I)中、Zはアルキレン基単独、もしくはエーテル結合、エステル結合、ウレタン結合、アミド結合、カーボネート結合または2級アミノ基を含むアルキレン基を示す。Yは炭素数1～10のフッ素原子を含んでも良い炭化水素基を示す。)

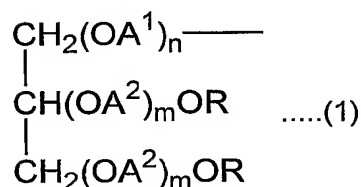
10. Xが群(I I)より選択される基である、請求項5～8のいずれか一つの請求項に記載の中間体。

群(I I)



(群(I I)中、Zはアルキレン基単独、もしくはエーテル結合、エステル結合、ウレタン結合、アミド結合、カーボネート結合または2級アミノ基を含むアルキレン基を示す。)

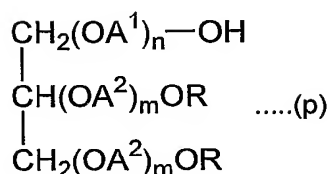
11. 分子中に少なくとも1個の下記式(1)で表されるポリアルキレングリコールオキシ基を結合してなる、修飾された生体関連物質を製造する方法であって、生体関連物質に対して、請求項5～10のいずれか一つの請求項に記載の中間体を結合する工程を有することを特徴とする、修飾された生体関連物質の製造方法。



(式中、Rは炭素数1～24の炭化水素基であり、OA¹、OA²は炭素数2～4のオキシアルキレン基であり、R、OA²は一分子中で互いに同一または異なっており、nおよびmは前記オキシアルキレン基の平均付加モル数であり、nは0～1000を示し、mは10～1000を示す。)

12. 請求項11記載の方法によって得られることを特徴とする、修飾された生体関連物質。

13. 下記式(p)で表されることを特徴とする、実質的に2級水酸基を含まない、請求項5記載の中間体の原料であるポリアルキレングリコール誘導体。



(式中、Rは炭素数1～24の炭化水素基であり、OA¹、OA²は炭素数2～4のオキシアルキレン基であり、R、OA²は一分子中で互いに同一または異なっており、nおよびmは前記オキシアルキレン基の平均付加モル数であり、nは0～1000を示し、mは10～1000を示す。)

14. 式(p)において、Rがメチル基であり、OA¹、OA²がオキシエチレン基であり、nが0～50であり、mが20～800である、請求項13記載のポリアルキレングリコール誘導体。

15. 式(p)において、nが0である、請求項13または14記載のポリアルキレングリコール誘導体。

16. 式(p)において、nが1～50である、請求項13または14記載のポリアルキレングリコール誘導体。

17. 式(p)で表わされるポリアルキレングリコール誘導体のゲル浸透クロマトグラフィーにおいて、溶出開始点から溶出終了点までの全ピークにおける多分散度 Mw/Mn が、
 $Mw/Mn \leq 1.07$

なる関係を満足する、請求項13～16のいずれか一つの請求項に記載のポリアルキレングリコール誘導体。

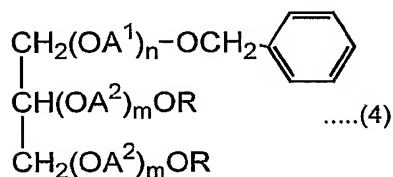
18. 式(4)の化合物を原料とし、下記パラメータを満足する、請求項13～17のいずれ

か一つの請求項に記載のポリアルキレングリコール誘導体。

$$Hrd / Mp \times 1000000 \leq 3$$

Mp: 式 (p) のゲル浸透クロマトグラフィーより得られる、ピーク頂点に相当する分子量

Hrd: 式 (4) の化合物における 2 位と 3 位のポリオキシアリレン鎖末端において、アルキル基 R に含まれる水酸基残基の割合



(式中、R、OA¹、OA²、n および m は前記と同じである。)

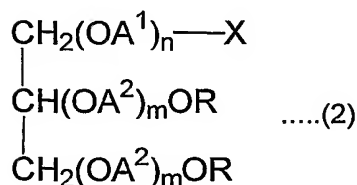
19. 下記パラメータを満足する、請求項 15、17 または 18 記載のポリアルキレングリコール誘導体。

$$M2 / (M1 + M2) \times 100 \leq 10$$

M1: 式 (p) で表わされる化合物とメタンスルホニルクロリドを反応させてメシル化物を得、重メタノール溶液で核磁気共鳴スペクトルを得た際、グリセロール骨格に直接結合した 1 位の水酸基から誘導されたメシル基由来のメチル基積分値

M2: ポリアルキレングリコール鎖の水酸基から誘導されたメシル基由来のメチル基積分値

20. 請求項 13 ~ 19 のいずれか一つの請求項に記載のポリアルキレングリコール誘導体を原料として用いることを特徴とする、式 (2) で表される修飾された生体関連物質の中間体の製造方法。



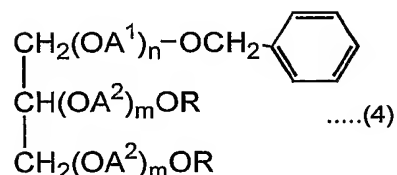
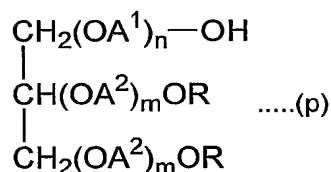
(式中、R は炭素数 1 ~ 24 の炭化水素基であり、OA¹、OA² は炭素数 2 ~ 4 のオキシアリキ

レン基であり、R、OA²は一分子中で互いに同一または異なっており、nおよびmは前記オキシアルキレン基の平均付加モル数であり、nは0～1000を示し、mは10～1000を示し、Xは、修飾前の生体関連物質と化学反応可能な官能基を示す)

21. 請求項20記載の方法によって得られることを特徴とする、修飾された生体関連物質の中間体。

22. 下記工程(A)を有することを特徴とする、式(p)のポリアルキレングリコール誘導体の製造方法。

工程(A)：式(4)で示される化合物を、反応系中の水分量を1%以下の条件で水素化還元反応させる工程



(式中、Rは炭素数1～24の炭化水素基であり、OA¹、OA²は炭素数2～4のオキシアルキレン基であり、R、OA²は一分子中で互いに同一または異なっており、nおよびmは前記オキシアルキレン基の平均付加モル数であり、nは0～1000を示し、mは10～1000を示す)

23. 工程(A)において、水素化還元触媒にパラジウムを使用し、パラジウム量を式(4)の化合物に対して1～20重量%で添加し、かつ反応温度を40℃以下で行うことを特徴とす

る、請求項 2 2 記載の方法。

2 4. 工程 (A) の前工程として、下記工程 (B 1) ～工程 (B2) を行うことを特徴とする、請求項 2 2 または 2 3 記載の方法。

工程 (B 1) : 式 (5) で示される化合物に対し、脱ハロゲン剤、式 (6) で示される化合物を加え、20～60℃において反応させ、式 (7) の化合物を得る工程。このとき、各々の仕込みモル比は下記関係を満足する。

$$V_c \geq 3 V_a$$

$$V_b > V_c$$

V_a : 式 (5) で示される化合物のモル数

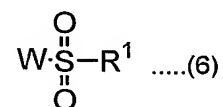
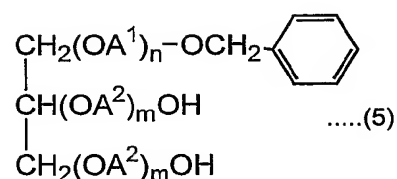
V_b : 脱ハロゲン剤のモル数

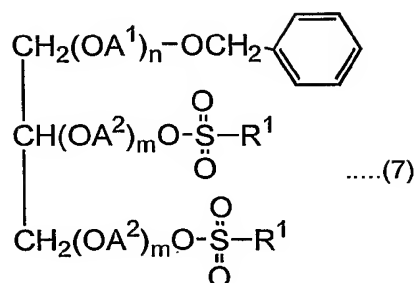
V_c : 式 (6) で示される化合物のモル数

工程 (B 2) : 式 (7) の化合物に、式 (8) で示される化合物を加え、20～80℃において反応させて式 (4) の化合物を得る工程。このとき、各々の仕込みモル比は下記関係を満足する。

$$V_d > V_c$$

V_d : 式 (8) で示される化合物のモル数





(式中、 OA^1 、 OA^2 、 n および m は前記と同じである。 W は Cl 、 Br 、 I から選択されるハロゲン原子である。 R^1 は炭素数1～10の炭化水素基である。)

R—OM(8)

(式中、 R は炭素数1～24の炭化水素基であり、 M はカリウムまたはナトリウムである。)

25. 工程(B2)の後工程として、工程(B3)を有することを特徴とする、請求項24記載の方法。

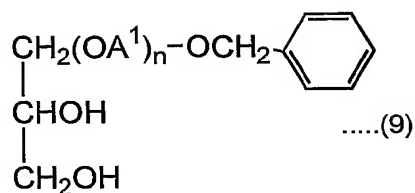
工程(B3)：反応液をろ過、又は反応液を10重量%以上の濃度の無機塩水溶液で水洗する工程。

26. 工程(B3)の後、工程(B1)～工程(B3)を繰り返すことを特徴とする、請求項25記載の方法。

27. 工程(B1)～(B3)の前工程として、下記工程(C1)～工程(C2)を有することを特徴とする、請求項25または26記載の方法。

工程(C1)：式(9)で示される化合物に対して、ナトリウム又はカリウムを5～50モル%の量を添加し、10～50℃で溶解する工程、

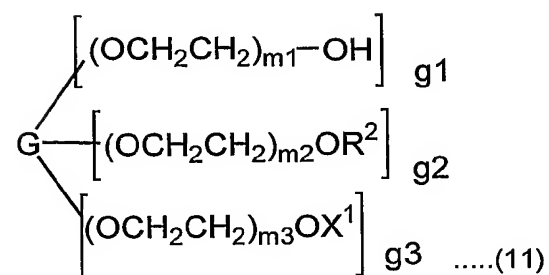
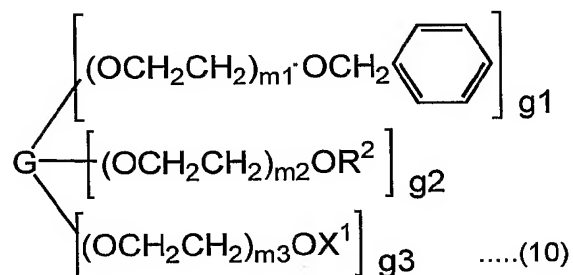
工程(C2)：アルキレンオキシドを50～130℃で反応させる工程



(式中、 OA^1 は前記と同じである。)

28. 下記工程(AA)を有することを特徴とする、式(11)のポリエチレングリコール誘導体の製造方法。

工程(AA)：式(10)で示される化合物を、反応系中の水分量を1%以下の条件で、パラジウム量を式(10)の化合物に対して1~20重量%添加し、かつ反応温度40℃以下で水素化還元反応させる工程



(式中、Gは2~4個の水酸基を有する化合物の残基であり、 R^2 は炭素数1~4の炭化水素基である。 $m1$ 、 $m2$ 、 $m3$ はオキシエチレン基の平均付加モル数であり、下記関係を満たす。

$$0 \leq m1 \leq 1000, \quad 0 \leq m2 \leq 1000, \quad 0 \leq m3 \leq 1000, \quad 10 \leq m1 + m2 + m3 \leq 1000$$

X¹はアミノ基、カルボキシ基、あるいはそれらの保護基である。g 1、g 2、g 3は各々整数を表わし、下記関係式を満たす。

$$1 \leq g_1 \leq 3, \quad 0 \leq g_2, \quad 0 \leq g_3, \quad 2 \leq g_1 + g_2 + g_3 \leq 4$$

29. 下記工程(BB1)～工程(BB3)を有することを特徴とする、式(16)で示されるポリエチレングリコール誘導体の製造方法。

工程(BB1)：式(12)で示される化合物に対し、脱ハロゲン剤、式(14)で示される化合物を加え、20～60℃において反応させ、式(13)の化合物を得る工程。このとき、各々の仕込みモル比は下記関係を満足する。

$$V_j \geq 1.5 \times V_h \times g_5$$

$$V_i > V_j$$

V_h：式(12)で示される化合物のモル数

V_i：脱ハロゲン剤のモル数

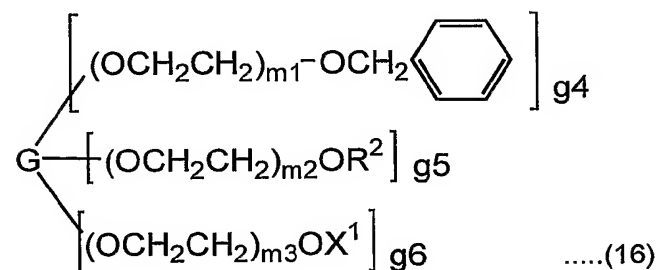
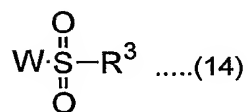
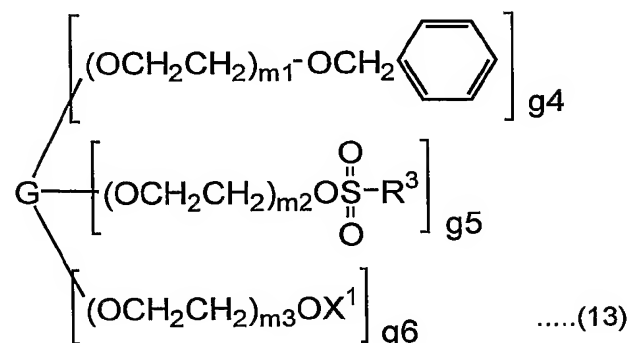
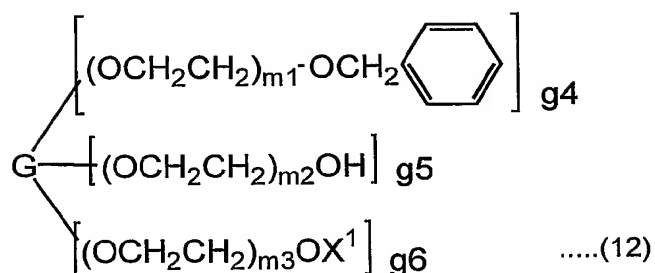
V_j：式(14)で示される化合物のモル数

工程(BB2)：式(13)の化合物に、式(15)で示される化合物を加え、20～80℃において反応させて式(16)の化合物を得る工程。このとき、各々の仕込みモル比は下記関係を満足する。

$$V_k > V_j$$

V_k：式(15)で示される化合物のモル数

工程(BB3)：反応液を濾過し、または反応液を10重量%以上の濃度の無機塩水溶液で水洗する工程



(式中、G は 2 ～ 4 個の水酸基を有する化合物の残基であり、R² は炭素数 1 ～ 4 の炭化水素基である。m₁、m₂、m₃ はオキシエチレン基の平均付加モル数であり、下記関係を満たす。

$$0 \leq m_1 \leq 1000, \quad 0 \leq m_2 \leq 1000, \quad 0 \leq m_3 \leq 1000, \quad 10 \leq m_1 + m_2 + m_3 \leq 1000$$

X¹ はアミノ基、カルボキシル基、あるいはそれらの保護基である。

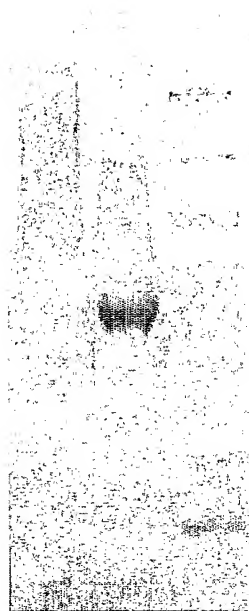
g₄、g₅、g₆ は各々整数を表わし、下記関係式を満たす。

$$0 \leq g_4, \quad 1 \leq g_5 \leq 3, \quad 0 \leq g_6, \quad 2 \leq g_4 + g_5 + g_6 \leq 4$$

WはC l, B r、I から選択されるハロゲン原子である。R³は炭素数1～10の炭化水素基である。

Mはカリウムまたはナトリウムである。)

図 1



(A) (B) (C)

図 2

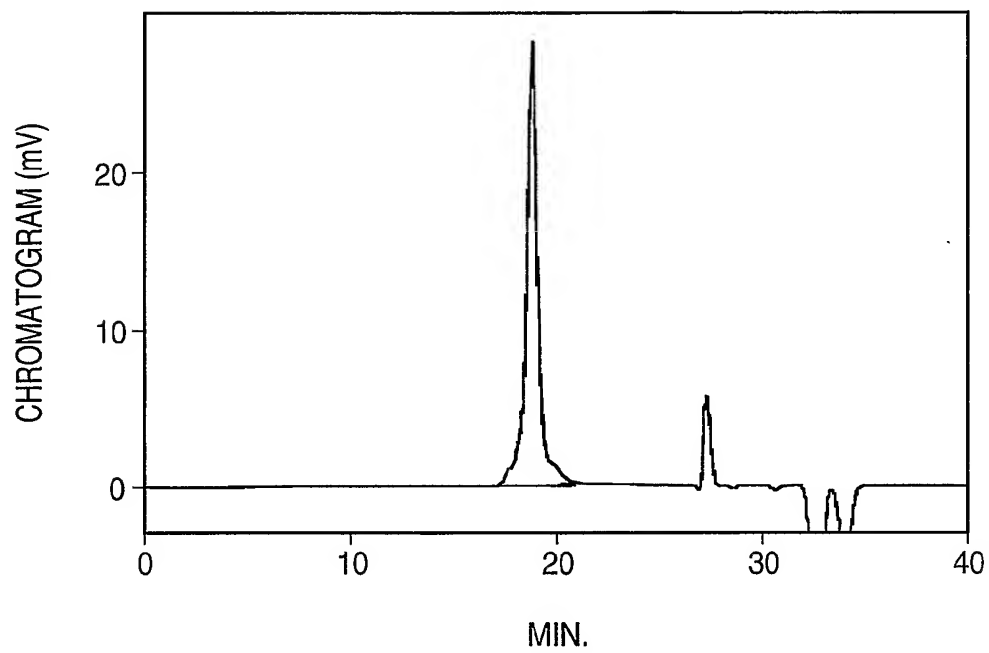


図 3

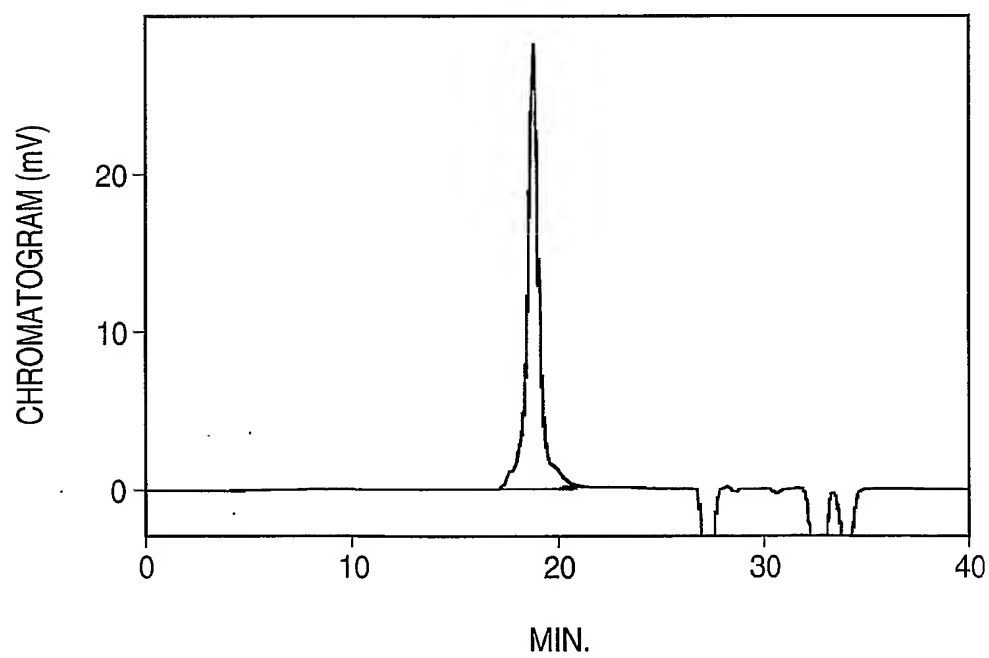


図 4

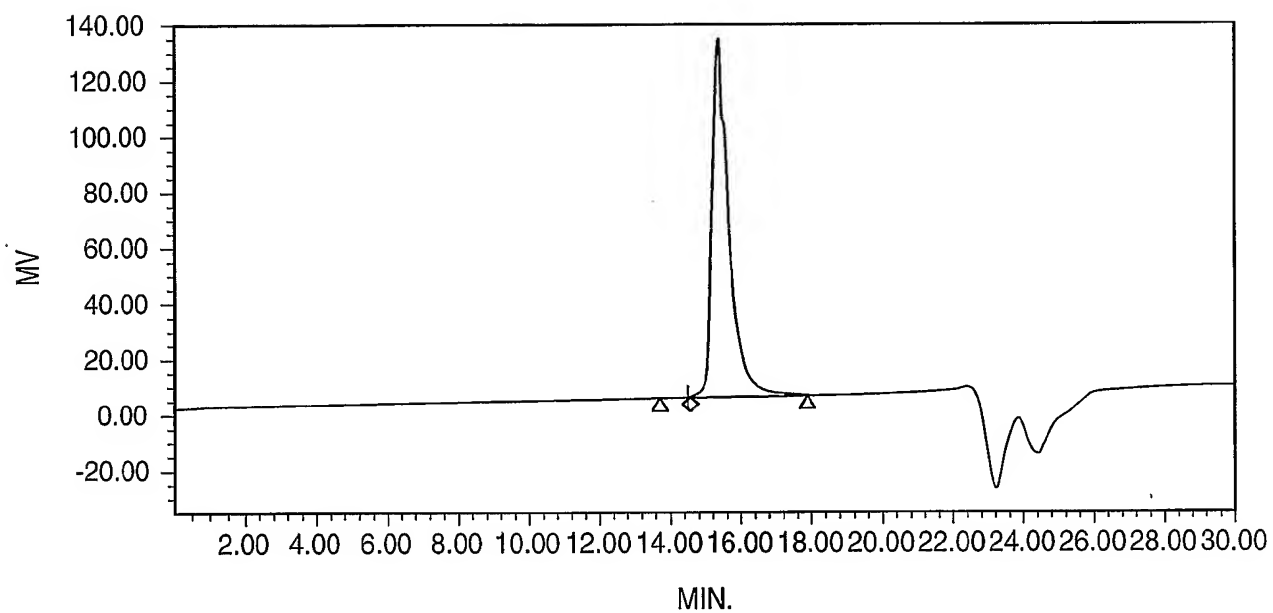


図 5

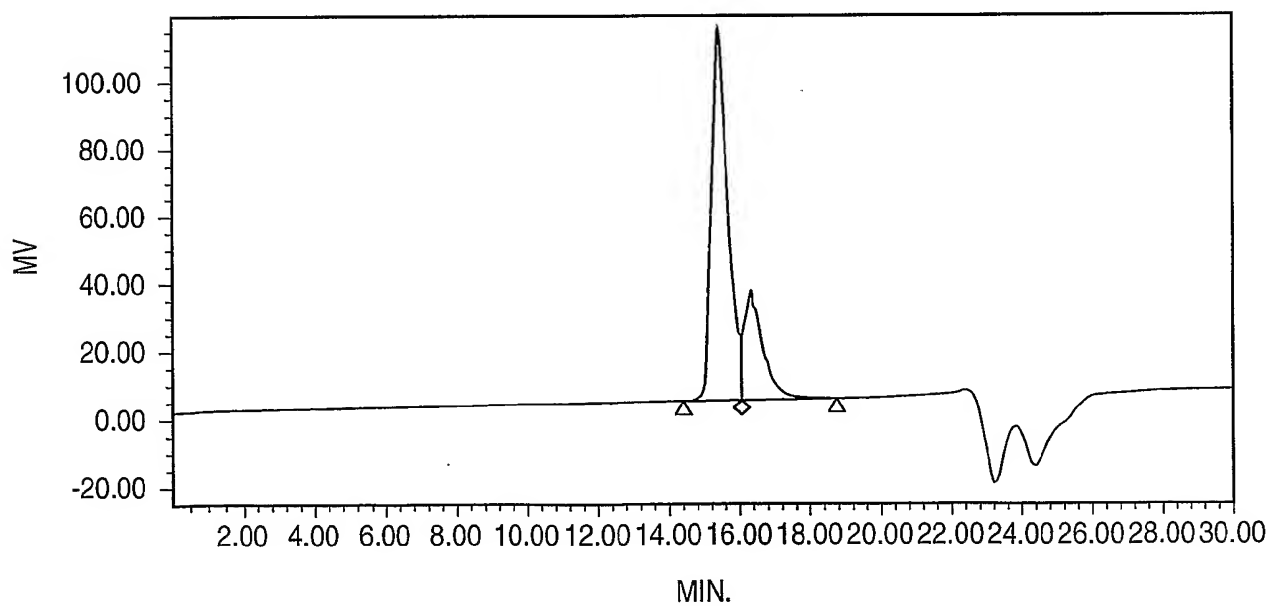


図 6

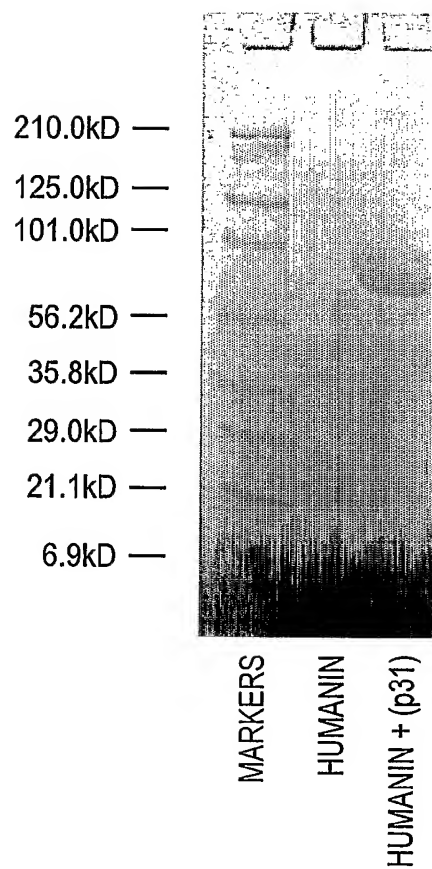
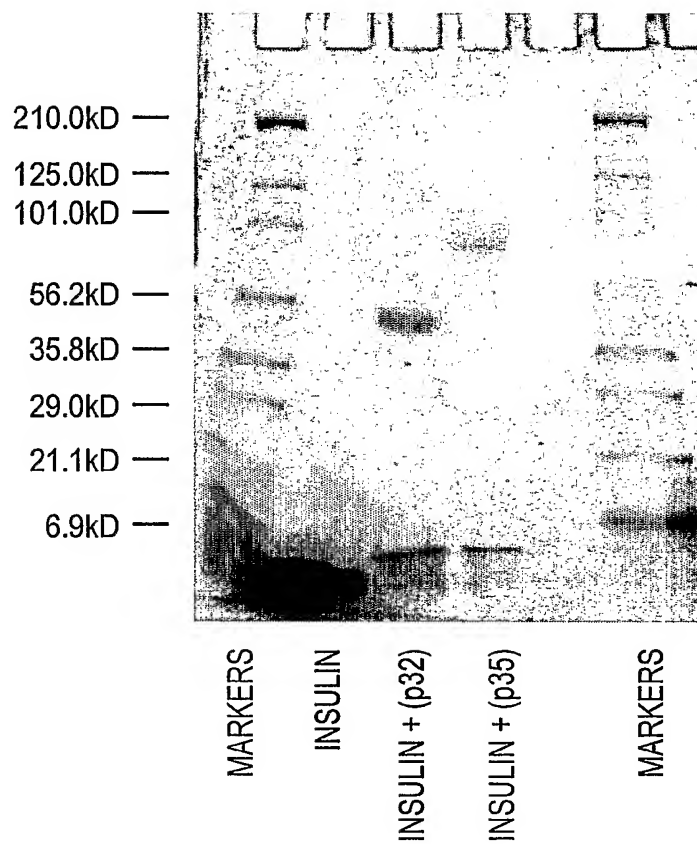


図 7



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/14844

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C08G65/32, A61K47/48, A61K38/17, A61K38/43, A61P43/00,
C08G65/28

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C08G65/00-C08G67/04, A61K47/48, A61K38/17, A61K38/43,
A61P43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CA (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 08-059818 A (NOF Corp.), 05 March, 1996 (05.03.96), Claims; Par. Nos. [0005] to [0008], [0013] (Family: none)	1-8, 11-16, 20, 21
X	JP 11-228685 A (NOF Corp.), 24 August, 1999 (24.08.99), Claims; Par. Nos. [0018] to [0031], [0046] to [0051], [0057] to [0062] (Family: none)	1-8, 11, 12
X	JP 2000-001541 A (NOF Corp.), 07 January, 2000 (07.01.00), Claims; Par. Nos. [0014] to [0025], [0037] to [0041] (Family: none)	1-8, 11, 12

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not
considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing
date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is
cited to establish the publication date of another citation or other
special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other
means

"P" document published prior to the international filing date but later
than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or
priority date and not in conflict with the application but cited to
understand the principle or theory underlying the invention
document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered novel or cannot be considered to involve an inventive
step when the document is taken alone
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered to involve an inventive step when the document is
combined with one or more other such documents, such
combination being obvious to a person skilled in the art
"Y" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
12 February, 2004 (12.02.04)

Date of mailing of the international search report
24 February, 2004 (24.02.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/14844

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, A	JP 2003-113241 A (NOF Corp.), 18 April, 2003 (18.04.03), Full text & EP 1283233 A & KR 2003013256 A & US 20030065134 A	1-29
A	JP 06-145341 A (NOF Corp.), 24 May, 1994 (24.05.94), Full text (Family: none)	1-29

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/14844

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Claims 1-27 pertain to a polyalkylene glycol derivative represented by the formula (p), a process for producing the derivative, an intermediate produced from the derivative as a starting material, a process for producing the intermediate, a biological substance produced from the intermediate, and a process for producing the substance.

Claim 28 pertains to a process for producing a polyethylene glycol derivative represented by the formula (11), which has no novel structure common to the formula (p).

Claim 29 pertains to a process for producing a polyethylene glycol derivative (continued to extra sheet)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/14844

Continuation of Box No. II of continuation of first sheet(1)

represented by the formula (16), which has no novel structure common to the formula (p).

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int.Cl ⁷ C08G65/32, A61K47/48, A61K38/17, A61K38/43, A61P43/00, C08G65/28		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int.Cl ⁷ C08G65/00~C08G67/04, A61K47/48, A61K38/17, A61K38/43, A61P43/00		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
CA (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP 08-059818 A (日本油脂株式会社) 1996.03.05 特許請求の範囲及び段落番号【0005】~【0008】、【0013】、(ファミリーなし)	1-8、11-16、 20、21
X	JP 11-228685 A (日本油脂株式会社) 1999.08.24 特許請求の範囲及び段落番号【0018】~【0031】、【0046】~【0051】、【0057】~【0062】、(ファミリーなし)	1-8、11、12
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 12.02.2004	国際調査報告の発送日 24.2.2004	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 吉澤 英一	4 J 3346
電話番号 03-3581-1101 内線 3455		

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1-27は、式(p)のポリアルキレングリコール誘導体、該誘導体の製造方法、該誘導体を原料とする中間体、該中間体の製造方法、該中間体を用いて製造する生体関連物質及び該物質の製造方法である。
請求の範囲28は、式(p)と新規な共通の構造を有しない式(11)のポリエチレングリコール誘導体の製造方法である。
請求の範囲29は、式(p)と新規な共通の構造を有しない式(16)のポリエチレングリコール誘導体の製造方法である。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。